



Revue Francophone des Laboratoires



**Volume 2016, Issue 482,
Pages 3-90
(Mai 2016)**

 LEMONDEDESPHARMACIENS

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](https://www.facebook.com/LEMONDEDESPHARMACIENS)

 [#LemondedesPharm](https://twitter.com/LemondedesPharm)

Elsevier Masson SAS
Société par actions simplifiées
à associé unique
au capital de 47 275 384 €
RCS Nanterre B 542 037 031
62, rue Camille-Desmoulins
92130 Issy-les-Moulineaux



Tél./Fax : 01 71 16... + les 4 chiffres
de votre correspondant
<http://www.elsevier-masson.fr>

PRÉSIDENT ET DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :
Daniel Rodriguez

DIRECTRICE DES REVUES PROFESSIONNELLES

Yasmina Ouharzoune
y.ouharzoune@elsevier.com

RÉDACTRICE EN CHEF :

Martine Tirouche
m.tirouche@elsevier.com

CONSULTANT SCIENTIFIQUE DE LA RÉDACTION :

Claude Naudin
clinaudin@numericable.fr

COLLABORATEURS DE LA RÉDACTION :

Revue de presse :
Joël Gozlan, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès,
Vincent Maréchal, Michel Segondy
Actualités — Santé publique — Veille juridique :
Jean-Marie Manus

FAX-RÉDACTION : 01 71 16 51 59

MARKETING – RESPONSABLE DE MARCHÉ :

Sonia Tadjdet (58 60)
s.tadjdet@elsevier.com

PUBLICITÉ – DIRECTEUR DES VENTES :

Jean-Marie Pinson (53 10)
Mobile : 06 15 72 16 73
j.pinson@elsevier.com

SERVICE ABONNEMENTS :

Tél. : 01 71 16 55 99 – Fax : 01 71 16 55 77
<http://www.em-consulte.com/infos>

PAO : humancom, 48 rue de Dantzig, 75015 Paris.

IMPRESSION :

Lescure Théol, 27 Douains.

Copyright © 2016 — Elsevier Masson SAS — Tous droits réservés. Cette publication et son contenu sont protégés par le copyright de Elsevier Masson SAS, et les dispositions suivantes s'appliquent à son utilisation : Les simples photocopies d'articles isolés sont autorisées pour un usage privé, dans la mesure où les lois nationales relatives au copyright le permettent. L'autorisation de l'éditeur et le paiement de redevances est obligatoire pour toutes les autres photocopies, y compris les copies multiples ou systématiques, les copies effectuées à des fins promotionnelles ou de publicité, la revente et toute autre forme de distribution de documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les institutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peuvent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevances correspondantes auprès du Centre Français d'Exploitation du Droit de la Copie (20, rue des Grands-Augustins, F – 75006 Paris). Les abonnés sont autorisés à effectuer des copies des tables des matières, ou établir des listes d'articles comprenant des extraits pour un usage interne à l'intérieur de leurs institutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute revente ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'éditeur est requise pour tous autres travaux dérivés, y compris les compilations et les traductions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour saisir de façon électronique tout élément contenu dans la présente publication, y compris tout ou partie d'un article. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indiquée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, saisie dans un système de sauvegarde, ou transmise sous quelque forme que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, sans l'autorisation préalable et écrite de l'éditeur. La responsabilité de l'éditeur ne saurait en aucune façon être engagée pour tout préjudice et/ou dommage aux personnes et aux biens, que cela résulte de la responsabilité du fait des produits, d'une négligence ou autre, ou de l'utilisation de tous produits, méthodes, instructions ou idées contenus dans la présente publication. En raison de l'évolution rapide des sciences médicales, l'éditeur recommande qu'une vérification extérieure intervienne pour les diagnostics et la posologie.

CPPAP 0117 T 81120 – ISSN 1773-035x

Dépôt légal : à parution

Couverture

© DR

Index des annonceurs

Biorad	4 ^e de couv.
Elsevier Masson	4 - 22 - 34 - 38 - 48 - 60 - 81
Elitech	13
Fumouze	15
Reed Exhibitions	2 ^e de couv

édito

Ces médecins qui vieillissent

Il y a quelques années l'Académie nationale de médecine a proposé une formule juste pour tester la capacité des automobilistes sénescents à conduire, au moyen d'exams biomédicaux périodiques à mesure de l'avancée en âge, la voiture favorisant une autonomie dont on ne peut les priver sans raison.

Doit-on faire de même pour évaluer la capacité à continuer d'exercer des professionnels de santé, au-delà d'une limite fixée arbitrairement à 65 ans. Le sujet est sérieux, il a été abordé dans une réunion de l'AMA¹, l'Association médicale américaine. Bref, faut-il des directives nationales (*guidelines*) pour tester la capacité d'un médecin à continuer d'exercer malgré son âge ?

À ce propos, la démographie médicale française va mal, en régions ce déficit fait l'objet de reportages télévisés, qui nous montrent souvent des médecins vieillissants, qui ne veulent pas abandonner leurs patients, leurs familles, tandis qu'à la fac de futurs médecins se rêvent spécialistes en ville.

Le ministère vient de reconnaître que le contrat d'engagement de service public, destiné à amener des généralistes à la campagne, ne fonctionne pas bien. Avec le développement des maisons de santé en milieu rural et l'insuffisance de recrutement pour ce milieu, la question du vieillissement des praticiens y exerçant se posera.

Bref, les vieux médecins vont-ils peupler villages et campagnes ? Les États-Unis connaissent aussi ce problème : là-bas, il y a des zones de pénurie démographique, et des vieux médecins qui ne veulent pas lâcher la rampe. Depuis 1975, le nombre de médecins d'au moins 65 ans a plus que quadruplé, ils étaient 241 000 en 2013. La question se pose d'évaluer leurs compétences, en ville, à la campagne, et à l'hôpital où là-bas, ils ne sont pas poussés à prendre leur retraite...

La réunion de l'AMA a abordé la légalité de l'évaluation des médecins âgés, évaluation (*screening*) des pratiques en fonction de l'âge – en tenant compte des effets variables de la sénescence sur la compétence – de l'incertitude sur la façon de tester les fonctions cognitives et motrices – des effets d'autres variables sur les compétences et les performances, etc. L'AMA compte sur les médecins pour s'auto-évaluer en fonction de leur âge, quitte à les aider à admettre leur savoir-faire déclinant (*recognize their declining skills*) !

RFL

1. www.ama-assn.org

Conseil scientifique

PRÉSIDENT : Paul LAFARGUE (Paris).

BUREAU : Bruno BAUDIN (Paris), Dominique CHABASSE (Angers), Alain CHEVAILLER (Angers), Éric GARNOTEL (Marseille), Michèle IMBERT (Créteil), Marie-Laure JOLY-GUILLOU (Angers), Marc MAYNADIÉ (Dijon), Michel SEGONDY (Montpellier).

COMITÉ :

MEMBRES FRANÇAIS : Frédéric BARBUT (Paris), Patrice BOURÉE (Le Kremlin-Bicêtre), René CHERMETTE (Maisons-Alfort), Claude GUIGUEN (Rennes), Paul HOFMAN (Nice), François JEHL (Strasbourg), Saïd KAMEL (Amiens), Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA (Lyon), Jean-Jacques LATAILLADE (Clamart), Jean-Philippe LAVIGNE (Nîmes), Jérôme LE GOFF (Paris), Michèle MALET (Caen), Vincent MARÉCHAL (Paris), Denis MASSIGNON (Lyon), Thierry MOLINA (Paris).

MEMBRES ÉTRANGERS : Smail BELAZZOUG (Algérie), Ahcène DEMBRI (Algérie), Hicham OUAZZANI (Maroc), Lassaad SARRAI (Tunisie), Abderrahim TAZI (Maroc).

MEMBRES HONORAIRES : Marie-Hélène BESSIÈRES (Toulouse), Jean-Louis KOECK (Bordeaux), Anne-Marie MANEL (Champagne-au-Mont-d'Or), Jean-Claude NICOLAS (Chatou/Princeton, USA), Michel VAUBOURDOLLE (Paris).

Abusus non tollit usum

Prestations de conseil (11)

Vascularite et maladie de Horton

Une femme de 62 ans se présente au laboratoire avec une prescription de son généraliste pour bilan d'asthénie avec amaigrissement et fièvre modérée. En salle de prélèvement, le biologiste complète les renseignements cliniques : la patiente déclare l'apparition récente de céphalées soudaines et se plaint d'une raideur musculaire au niveau du cou et des épaules ainsi que de troubles visuels fugaces (brouillard, réduction du champ). De plus elle mentionne des douleurs du cuir chevelu en se coiffant.

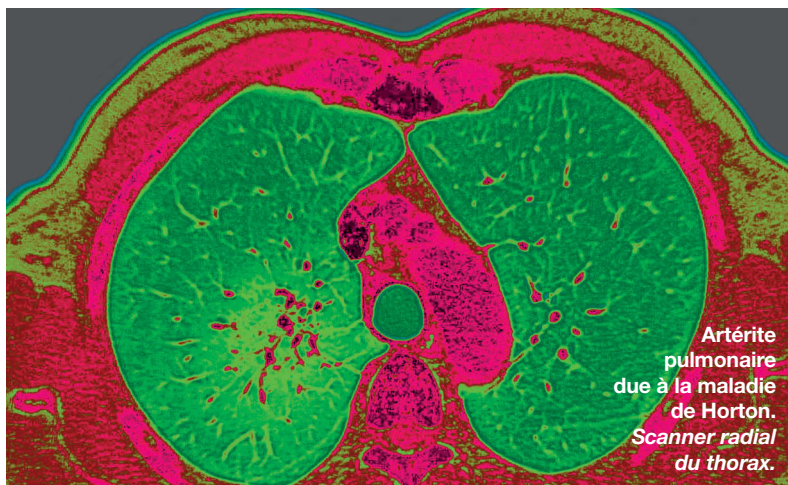
Résultats biologiques

Les résultats des examens biologiques effectués indiquent l'existence d'un syndrome inflammatoire avec anémie (Hb = 110 g/L, VS 1^{re} heure = 70 mm, CRP = 90 mg/L). Les ASAT, ALA et PAL sont à deux N ; une hyperleucocytose neutrophile et une thrombocytose sont également notées. L'électrophorèse confirme le syndrome inflammatoire avec hyper IgA polyclonale.

Devant ce bilan associé à l'anamnèse, la concertation clinico-biologique conduit à évoquer une vascularite et très probablement une maladie de Horton (*voir encadrés 1 et 2*).

Elle sera traitée par corticothérapie sans attendre le résultat de la biopsie temporale car c'est une urgence clinique (risque de cécité bi-latérale).

Enfin, c'est juste mon avis.
Claude Naudin
 clnaudin@numericable.fr



Encadré 1

Classification anatomo-clinique des vascularites

- **Vascularites nécrosantes (type périartérite noueuse - PAN)**
 - concerne la femme ou l'homme quel que soit l'âge, les manifestations cutanées, neuromusculaires et rénales sont les plus fréquentes,
 - la morbi-mortalité est associée aux infarctus et anévrysmes,
 - association possible avec un Horton.
- **Vascularites leucocytoclasiques**
 - type angéite d'hypersensibilité,
 - type purpura rhumatoïde.
- **Artérites lymphocytaires** maladie de Takayashu (enfant et jeune femme).
- **Les artérites « granulomateuses »**
 - **maladie de Horton**,
 - les angéites de type Churg et Strauss,
 - atteinte pulmonaire et éosinophilie,
 - la granulomatose de Wegener prédomine chez l'adulte avec présence d'ANCA (Ac anti-cytoplasme des PN); atteinte des voies aériennes supérieures et des poumons et glomérulonéphrites.

Encadré 2

Maladie de Horton

- La maladie de Horton (artérite giganto-cellulaire) est une panartérite à cellules géantes segmentaire et plurifocale (vaisseaux de moyen et de gros calibres) du territoire céphalique dont l'artère temporale.
- Avant 50 ans la maladie reste exceptionnelle, l'atteinte féminine la plus fréquente. Asthénie, fièvre, amaigrissement peuvent être les seuls signes prodromiques. Les céphalées sont retrouvées dans environ 60 % des cas et sont souvent révélatrices.
- La bi-latéralisation de l'amaurose peut survenir dans un délai bref de un à quelques jours.
- Il existe une association avec la présence de l'antigène HLA-DR4 (allèle HLA-DRB1*04).
- Signes locaux temporaux, avec diminution de la pulsatilité d'une artère temporale.
- Manifestations ischémiques le plus souvent oculaires survenant dans un contexte inflammatoire.
- Sensibilité de l'artère temporale à la palpation ou diminution du pouls temporal.
- Vascularite sur une biopsie artérielle caractérisée par un infiltrat de type granulomateux (cellules géantes multinucléées).
- Implication des T lymphocytes et profil de sécrétion TH1 des cytokines.
- La corticothérapie est le seul traitement permettant de supprimer la symptomatologie et de diminuer le risque de cécité (0,7 mg/kg/jour de Prédnisone).
- L'adjonction d'un traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire est recommandée.

BRÈVES

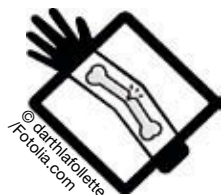


© royaltystockphoto / Fotolia.com

Lyme: il n'y a pas que *B. burgdorferi*

Des scientifiques de la Mayo Clinic (Rochester) ont rapporté la découverte d'une seconde espèce de bactérie dont les tiques seraient le vecteur et qui serait impliquée dans la maladie de Lyme. On connaissait *Borrelia burgdorferi*, nommée d'après le bactériologiste américain Willy Burgdorfer qui l'identifia. Cette bactérie a été nommée *Borrelia mayonii*, d'après la Mayo Clinic, dont les bactériologistes ont vu passer une dizaine de patients porteurs en 2 ans, sur quelque 9 000 examinés. Leurs observations sont parues récemment dans *The Lancet Infectious Diseases*. Comme *burgdorferi*, *mayonii* est propagée par la morsure de tique à pattes noires aux USA. Signes et symptômes sont similaires: fièvre, céphalée, rash, douleur de la nuque dans les jours de l'infection, douleurs articulaires et arthrite dans les semaines suivantes. Discriminer entre les deux vecteurs n'est pas toujours facile. Le test de diagnostic de la maladie de Lyme¹ devrait s'appliquer au nouveau vecteur, le traitement antibiotique est le même, selon les CDC. La détection de *B. mayonii* reste rare.

1. <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/lyme/>



© dartinollette / Fotolia.com

De la céramique pour réparer l'os

De nouveaux matériaux en biocéramique résorbable destinés aux fractures osseuses pourraient bientôt être accessibles en Europe, grâce au projet de recherche RESTORATION, qui a étudié notamment 3 types de remplacement: mandibule, vertèbres et genoux. Le projet, coordonné par l'Université de Newcastle¹, a développé des biocomposites en céramique résorbable pour des applications orthopédiques et maxillo-faciales, qui peuvent imiter la structure de l'os et sont conçus pour se conformer aux exigences mécaniques des sites d'implantation. Ces céramiques sont bioactives, elles s'intègrent littéralement aux tissus. Exemples de développements: un matériau en biocéramique pour comblements osseux, un tampon imprimé en 3D pour le traitement de lésions ostéo-chondrales, une pâte en polymères et un ciment en composite ostéo-inductif injectables dans une vertèbre lésée. D'autres technologies sont au stade développement précoce et de pré-recherche avant commercialisation, tels une nouvelle conception de plaque pour fixation de fractures maxillo-faciales et un matériau injectable pour réparation ostéo-chondrale.

1. www.ncl.ac.uk



© lewzstock / Fotolia.com

Ebola: un traitement expérimental protège les modèles animaux

Un anticorps monoclonal dérivé des anticorps anti-Ebola isolés d'un sujet ayant survécu à une maladie à virus Ebola (MVE) a montré un effet protecteur contre le développement de celle-ci chez des *primates non humains* (macaques), même après une administration volontairement retardée de cinq jours suivant leur exposition à de fortes doses du virus. La prochaine étape est la vérification de la pertinence de ce traitement chez l'humain.

Cette approche originale pour un candidat-traitement de la MVE a été présentée par une équipe du *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), l'un des instituts spécialisés au sein des NIH américains. Le Dr Nancy J. Sullivan et coll. ont publié leurs observations concernant la façon de générer des anticorps monoclonaux (ACM) à partir du sérum de survivants à une MVE ancienne. Deux articles sur ce thème sont parus *on line* dans *Science* le 25 février.

L'équipe du NIAID a prélevé des échantillons sanguins chez un survivant de la MVE qui a émergé à Kikwit (République démocratique du Congo) en 1995. Des tests ont montré que plus de dix ans après l'infection, le patient possédait encore des anticorps anti-Ebola. C'est un organisme scientifique helvétique, l'Institut de recherche en biomédecine, qui a cloné les lymphocytes B sécrétant d'anticorps de ce sujet pour produire des ACM en vue d'un usage thérapeutique contre l'infection à Ebola.

N. Sullivan et coll. ont pu disposer de deux ACM (mAb110 and mAb114) qui ont exprimé la meilleure puissance contre le virus Ebola. Par la suite c'est au *Medical Research Institute of Infectious Diseases* de l'*US Army* qu'ont été administrées des doses létales d'*ebolavirus Zaïre* à quatre macaques rhésus, dont trois ont été traités par un mélange des ACM pendant trois jours de suite. Le quatrième animal, utilisé comme contrôle, a développé une MVE à laquelle il a succombé, les animaux traités survivants demeurant asymptomatiques des signes de MVE.

L'analyse de cette étude princeps ayant montré que l'ACM mAb114 est le plus puissant, il a été testé seul et c'est ici qu'a été déterminée la possibilité de ne traiter que cinq jours après l'exposition au virus. Pourquoi cinq jours? C'est le délai moyen dans lequel les services de santé reçoivent des sujets contaminés lors d'une flambée de MVE. Là encore, ce délai n'a pas compromis la survie des animaux, restés asymptomatiques de MVE.

Selon les données publiées par le NIAID, une analyse structurale a permis de comprendre le mode d'action des ACM contre le virus Ebola en s'opposant à sa colonisation des cellules de l'hôte, principalement mAb114: celui-ci se lie à un *site de vulnérabilité* du virus, qu'on pensait hors d'atteinte des anticorps. Pour N. Sullivan et coll., on montre ainsi la capacité d'un anticorps monoclonal à neutraliser le virus par ce mécanisme. Ceci ouvre bien sûr vers des études cliniques ultérieures.

Rappel: à l'occasion de la flambée de MVE 2014-2015 (plus de 11 000 décès) en Afrique de l'Ouest a été expérimenté un cocktail de 3 différents ACM, ZMapp (Mapp Biopharmaceuticals), qui fait l'objet d'évaluations chez l'humain. Les ACM sont obtenus en immunisant des souris et en clonant les cellules qui produisent les anticorps les plus efficaces. ■■

J.-M. M

Source: NIH Research Matters, 8/3/2016

eANOFEL : un nouvel outil d'iconographie en parasitologie et mycologie

Les infections parasitaires et fongiques occupent une place importante en maladies infectieuses et ce, sur tous les continents, notamment en raison de la mortalité et de la morbidité associées.

Dès sa création en 1988, les membres de l'Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers titulaires de Parasitologie et de Mycologie Médicale l'association (ANOFEL) ont eu à cœur de promouvoir et faciliter l'apprentissage en parasitologie et mycologie. Dans ce contexte, ses membres ont développé au cours de ces dix dernières années, différents supports pédagogiques parfaitement complémentaires, autant plébiscités par les étudiants en médecine et en pharmacie que par les praticiens en exercice : l'ouvrage *Parasitoses et Mycoses des régions tempérées et tropicales* (Elsevier Masson), le campus de Parasitologie-Mycologie de l'UNF3S et

le CD-Rom ANOFEL (4^e version parue en 2010), atlas d'iconographies accompagnées de légendes didactiques. Pour répondre aux nouveaux enjeux dans le domaine de l'enseignement, ce CD-Rom ANOFEL évolue maintenant vers un site internet, nommé «eANOFEL» dont nous avons le plaisir de vous annoncer la création.

Ce nouvel outil héberge déjà plus de 1 600 images et 30 séquences vidéos de parasites et de champignons d'intérêt médical concernant aussi bien le diagnostic au laboratoire (aspect morphologique macro- ou microscopique) que la pratique et le contexte clinique dans lequel ces infections sont observées. L'iconographie, sélectionnée par un comité scientifique², est structurée, comme dans les précédents supports, en sections thématiques : protozoaires, helminthes, mycologie, entomologie, épidémiologie, cycles évolutifs, etc. Au sein de chaque section, l'iconographie est organisée

par pathogène/infection. Un nouveau mode de recherche, utilisant un glossaire, a également été développé. Le site sera actualisé régulièrement et pourra être enrichi, dans l'avenir, d'un dispositif d'autoévaluation.

Ce site web éducatif devrait promouvoir et faciliter l'acquisition des connaissances dans le domaine du diagnostic des infections parasitaires et fongiques. Ce support s'inscrit dans la continuité des actions pédagogiques déjà menées par la collégiale ANOFEL. ■■

**Florent Morio
et Dominique Chabasse,
coordonnateurs eANOFEL**

1. <http://www.eanofel.fr>

2. **Membres du comité Scientifique**

eANOFEL : Didier Basset, Françoise Botterel, Pascal Delaunay, Claude Guiguen, Catherine Kauffmann-Lacroix, Laurence Lachaud, Jean-François Pays, Marc Pihet, Florent Morio et Dominique Chabasse.



	Aspect macroscopique des levures en culture Voir la diapositive ordre : 7530	V. Lavade
	Trichophyton schoenleinii - culture sur milieu de Sabouraud Voir la diapositive ordre : 9110	J-F. Pays
	Sinus: Aspergillite - anatomopathologie [HES x400] Voir la diapositive ordre : 9560	
	Cheveu: Piedra noire - aspect microscopique Voir la diapositive ordre : 10635	F. Persat
	Myiase furonculoïde - Cordylobia anthropophaga (ver de Cayor) Voir la diapositive ordre : 6820	B. Carme
	Piège à glossines Voir la diapositive ordre : 6790	G. Duvallet
	Echinophaga gallinacea (femelle adulte, 1 mm) Voir la diapositive ordre : 6650	J-F. Pays



© Sherry Young / Fotolia.com

Ebola : un test performant

Lors de la dernière édition de la conférence *Infectious Disease Week* à San Diego, une étude a fait état des constatations récentes concernant les performances du système Xpert Ebola pour le diagnostic de routine sur sang total et écouvillonnage buccal pour recherche du virus Ebola.

Présentant ces résultats, le Dr Nira R. Pollock (directeur associé, *Infectious Diseases Diagnostic Laboratory, Children's Hospital*, Boston) a rappelé que la plateforme Xpert a déjà fait preuve de sa fiabilité dans des lieux de soins aux ressources énergétiques limitées pour le diagnostic de la tuberculose. En mars 2015, le test Xpert Ebola de Cepheid, mis en application sur le système GeneXpert, a reçu de la FDA l'*Emergency Use Authorization*, l'autorisation d'utilisation accordée pour des raisons d'urgence sanitaire, pour la détection *in vitro* de l'agent de la maladie à virus Ebola (MVE) dans les laboratoires de tout niveau.

N. Pollock et coll. ont évalué les performances du *Xpert Ebola assay* sur 211 échantillons de sang veineux et 64 écouvillonnages buccaux dans un laboratoire de bioconfinement installé par l'association médicale *Partners In Health and Public Health England* (PHE) à Port Loko, en Sierra Leone, en comparant avec comme comparateur un test en PCR-temps réel déjà utilisé dans ce laboratoire (RT-PCR, Trombley) sur plasma et écouvillonnage buccal. Le test Xpert a comme cibles les gènes de la glycopro-

téine (GP) et de la nucléoprotéine (NP) de *Zaire ebolavirus*, la RT-PCR ne ciblant que la NP.

Le test Xpert a fait jeu égal avec la RT-PCR concernant les échantillons veineux positifs (sensibilité 100 %) et négatifs (sensibilité 95,8 %). Pour les échantillons buccaux, la sensibilité et la spécificité du test Xpert ont également été estimées à ou très proche de 100 %.

Les auteurs ont constaté l'excellente performance du test Xpert Ebola sur les deux types d'échantillons dans un laboratoire de terrain en comparaison d'un laboratoire de référence. En outre, estiment-ils, le test Xpert est potentiellement plus sensible que le test Trombley, notamment sur des échantillons avec une charge virale basse comme l'a montré cette étude. En outre, selon eux, ce test est plus facile d'usage, avec un temps total de mise en œuvre de 2 h et demie vs 4 h.

N. Pollock et coll. ont fait valoir néanmoins que le test et ses consommables devraient bénéficier d'une meilleure protection contre les températures extrêmes, l'inconvénient de la nécessité d'une source d'énergie permanente et d'un certain niveau d'expertise qui peuvent poser problème dans les installations aux ressources limitées. Autre nécessité : un système désactivant les échantillons à forte charge virale...

Mais on n'arrête pas le progrès en biologie, et le système GeneXpert sera prêt pour la prochaine épidémie africaine... ■■

J.-M. M.

Source : *Healio Infectious Disease*

Recommandations pour la FMF

La Ligue européenne contre le rhumatisme (EULAR), au cours du Congrès européen de rhumatologie, a fait connaître ses 18 recommandations pour la prise en charge de la fièvre méditerranéenne familiale (FMF). La première est de s'assurer que le diagnostic est posé par un spécialiste ayant l'expérience de la FMF. La première intervention thérapeutique dès le diagnostic fait appel préférentiellement à la colchicine, l'objectif est de maîtriser la maladie et réduire l'inflammation subclinique entre deux poussées. Les recommandations portent aussi sur les posologies de colchicine et la surveillance de sa toxicité. L'interruption de la colchicine durant la grossesse n'a pas été recommandée. Les recommandations ont été préparées par un panel de spécialistes de Méditerranée orientale, d'Europe et d'Amérique du Nord, composé de rhumatologues, d'internistes, de pédiatres, d'infirmière, de météorologiste médical et d'un représentant de patients. Les recommandations devraient être révisées et actualisées dans 5 ans.

Source : Ozen S, et al. *Ann Rheum Dis*. 2015; doi: 10.1136/annrheum-dis-2015-208690.



© Ipopba / Fotolia.com

Il y a trois ans, les visiteurs des JIB découvraient les automates de biologie de paille développés par Samsung, surtout connu pour ses ordinateurs et ses téléphones portables. Après avoir abordé le domaine du LBM, le leader sud-coréen de l'électronique aborde le marché européen des biothérapies (ou biopharmaceutiques) génériques, qu'on nomme biosimilaires.

Une division spéciale a été créée : Samsung Bioepis, qui vient de présenter sa première molécule biosimilaire, l'étanercept, ou Benepali®, qui a reçu le 18 janvier l'aval de la Commission européenne pour sa disponibilité dans les 28 États membres de l'Union européenne ainsi que dans les États membres de l'Espace économique européen (EEE) : Norvège, Islande et Liechtenstein.

L'étanercept est le principe actif du principe Enbrel®, traitement (biothérapie) de la polyarthrite rhumatoïde, de la polyarthrite

psoriasique, de la spondylarthrite ankylosante et du psoriasis en plaques. L'approbation de Benepali® fait suite à l'opinion positive du Comité des médicaments à usage humain (CHMP) de l'Agence européenne des médicaments (EMA) le 20 novembre dernier.

Ce premier biosimilaire a été développé et testé en 4 ans seulement par Samsung Bioepis. Le développement des biosimilaires, qui suppose des moyens pharmacologiques de haute technologie, devrait permettre d'abaisser les coûts des biothérapies et de les proposer à davantage de patients, dans des domaines de la santé nécessitant des médicaments d'exception, par exemple dans le domaine des maladies immunitaires.

Conformément à un accord de commercialisation signé en 2013 entre Samsung Bioepis et le laboratoire pharmaceutique américain Biogen, celui-ci dirigera la commercialisation et la distribution de Benepali® dans les États membres de l'UE et de l'EEE. Dans une étude clinique internationale de phase 3 [dernière étape avant l'AMM] d'un an Benepali® a démontré une sécurité



© iPopba / Fotolia.com

d'emploi comparable et une efficacité équivalente à celle du princeps, comme l'indique le taux de réponse au score fonctionnel international ACR20 de 80,8 % de Benepali® vs 81,5 % pour Enbrel®. L'étude regroupait 596 patients porteurs de polyarthrite rhumatoïde modérée à sévère non améliorés par le méthotrexate.

Samsung Bioepis ne cache pas ses ambitions européennes et internationales («devenir la plus grande société biophar-

maceutique au monde»), et a prévu, en collaborant avec des majors américains (Biogen, Merck & Co.), de présenter d'autres biosimilaires: Remicade® (infliximab), Humira® (adalimumab), Herceptin (trastuzumab), Lantus® (insuline glargine)... ■■

J.-M. M.

Source: Samsung Bioepis.

www.samsungbioepis.com

Création d'un prix en **oncologie gériatrique pluridisciplinaire**

Les Laboratoires Teva en partenariat avec la Société francophone d'oncologie gériatrique (SoFOG), annoncent le lancement du Prix Marguerite Oncologie, destiné à favoriser l'observance thérapeutique en oncologie et onco-hématologie chez les sujets âgés atteints de cancer.



© Monkey Business / Fotolia.com

Proposé dans tous les hôpitaux et cliniques de France métropolitaine, le Prix Marguerite Oncologie honorera une initiative mise en place par une équipe pluridisciplinaire au sein des services d'oncologie, d'onco-gériatrie et d'onco-hématologie pour favoriser l'observance quotidienne de leurs traitements par les patients âgés. Rappelons que, pour les deux sexes confondus, près d'un tiers des cancers sont diagnostiqués après l'âge de 75 ans, selon les données de l'Institut national du cancer (www.e-cancer.fr).

Le comité scientifique est composé de 6 experts : Pr Philippe Arnaud, Dr Elisabeth Carola, Pr Gilles Freyer, Pr Olivier Guerin, Pr Moïse Namer, Pr Pierre Soubeyran, qui désigneront l'équipe retenue pour l'attribution du prix au début de l'année 2017. L'évaluation du travail présenté par les équipes en lice reposera principalement sur le caractère innovant de l'organisation des soins et sur sa mise en œuvre pluridisciplinaire. L'équipe retenue par le jury recevra un prix d'un montant de 30 000 euros, destiné au développement du projet présenté.

Cette démarche s'inscrit dans l'approche pluridisciplinaire préconisée par les Laboratoires Teva dans un Livre Blanc des 20 recommandations pour améliorer le bon usage des médicaments chez les personnes âgées. Concernant par exemple la recommandation n° 18 : *Généraliser les entretiens de conciliation à la sortie de l'hôpital*, le promoteur du Prix Marguerite Oncologie estime que renforcer la coordination dans le parcours de soins est primordial. Exemple : lorsque les patients sortent de l'hôpital avec une nouvelle prescription, celle-ci ne prend pas toujours en compte les traitements pris habituellement par ailleurs.

Les candidatures sont ouvertes jusqu'au 30 juin 2016 et les dossiers sont collectés uniquement par mail : prixmarguerite-oncologie@meded.fr (règlement et dossier de candidature disponibles sur les sites www.teva-laboratoires.com et <http://sofog.org/>). ■■

J.-M. M.

Source: Laboratoire Teva.

BRÈVES

Un inhibiteur de l'hépatite delta



© decade3d / Fotolia.com

Le lonafarnid d'Eiger BioPharmaceuticals a reçu le statut de médicament orphelin de la FDA et de l'Agence européenne des médicaments pour le traitement de l'hépatite à virus delta (hépatite D). Ceci permet au laboratoire de commercialiser cette nouvelle molécule, un inhibiteur de la farnésyl transférase. Selon David Cory, PDG d'Eiger BioPharmaceuticals, l'hépatite delta est la forme la plus insidieuse d'hépatite virale, contre laquelle il n'existait aucune molécule approuvée FDA. C'est une avancée certaine que le lonafarnid soit agréé des deux côtés de l'Atlantique en tant que premier dans sa classe thérapeutique, pour une infection pour laquelle existait « un fort besoin médical non rempli ». Dans une étude de phase 2a randomisée en double aveugle, on a observé une réduction du taux d'ARN viral dose-dépendante (réduction de 0,7 log IU/mL avec 100 mg et 1,6 log IU/mL avec 200 mg) chez des patients porteurs d'une hépatite D chronique comparés à des patients sous placebo à 28 jours (réduction de 0,08 log IU/mL). Bien toléré le lonafarnid va subir d'autres essais de phase 2.

Infection à VIH et mortalité cardiovasculaire



© Rui Vale de Sousa / Fotolia.com

La mortalité cardiovasculaire des sujets VIH-positifs a plus que doublé entre 1999 et 2013. Une équipe de la Northwestern University Feinberg a évalué les données de la mortalité cardiovasculaire chez des adultes VIH-positifs. Bien que la mortalité totale dans la population des sujets infectés par le VIH ait diminué de 15 793 à 8 660 entre 1999 et 2013, en proportion la mortalité cardiovasculaire est passée de 1,95 % à 4,62 %, particulièrement chez les hommes ($P < 0,001$). Chez les adultes séropositifs la mortalité par cardiopathie ischémique a triplé, passant de 0,8 % à 2,5 %, tandis que dans la population générale elle passait de 22,8 % à 14,6 % dans le même temps. On observe aussi que les complications hypertensives et rénales sont impliquées dans la mortalité cardiovasculaire des HIV-positifs. Pour les auteurs, les modèles de prédiction cardiovasculaire (telles les données de l'étude de Framingham actualisée) ne s'appliquent pas à l'infection à VIH.

Source: Matthew Feinstein et coll. *Am J Cardiol.* 2015; doi: 10.1016/j.amjcard.2015.10.030.



© zilkovec / Fotolia.com

Conditions de naissance et d'allaitement et composition du microbiome

Une étude publiée on line dans JAMA Pediatrics montre que les conditions dans lesquelles naît un enfant et dans lesquelles il reçoit sa première alimentation influencent la composition de son microbiome (sa flore intestinale). En bref, il lui faut plutôt naître par les voies naturelles et recevoir un allaitement au sein plutôt que naître par césarienne et être nourri au biberon.

Pour résumer, l'accouchement par voie vaginale permet au nouveau-né d'acquérir les bonnes bactéries intestinales, la constitution de son microbiome étant peaufinée par les bonnes bactéries administrées par l'allaitement au sein de la mère. Ainsi se construit le système immunitaire du nourrisson en même temps qu'il reçoit les éléments d'une alimentation saine et adaptée à sa croissance. Ce constat émane d'une étude effectuée chez plus de 100 nouveau-nés à l'âge de 6 mois, qui a permis de constater la différence de composition du microbiome entre ceux nés par voie vaginale et ceux nés par césarienne. Il en était de même selon que l'alimentation initiale était maternelle ou au biberon. Le tout est de savoir si ces différences influent sur l'évolution ultérieure de la santé des enfants, reconnaissent les auteurs, Anne Gatewood Hoen, Juliette Madan et coll. (*Geisel School of Medicine at Dartmouth College in Lebanon, New Hampshire*). Néanmoins ils se disent surpris qu'à six mois de la naissance, selon les conditions de celle-ci et le mode d'allaitement, le microbiome intestinal semble formaté différemment. D'où constat: en favorisant l'accouchement par les voies naturelles et l'allaitement au sein exclusif [les deux chaque fois que possible], on favorise

l'implantation du microbiome et de ses effets rémanents.

Les auteurs avancent même que la naissance par césarienne (*cesarean delivery*) est associée avec une augmentation du risque d'obésité, d'asthme, de maladie cœliaque et de diabète de type 1, tandis que l'allaitement au sein (*breast-feeding*) a été associé à une réduction du risque d'asthme, d'obésité, d'infections, de syndrome métabolique et de diabète.

En définitive, c'est l'analyse des selles des nourrissons qui a permis de conclure [provisoirement ?] que la méthode d'accouchement avait au moins autant d'impact sur le microbiome que le mode d'allaitement... En outre, alterner allaitement au sein et au biberon compromet la qualité du microbiome, constat original de cette étude.

Cette étude est l'occasion de rappeler que chez l'enfant *in utero* l'intestin n'héberge aucune bactérie [axénique], l'organe se colonisant lors de l'accouchement car il passe par une filière qui n'est pas stérile alors que la césarienne suppose une désinfection dans une salle stérile, selon un expert, le Pr Mark Corkins (gastro-entérologue et nutritionniste, Centre des sciences de la santé, Université du Tennessee, Memphis); au pire, le nouveau-né acquiert des bactéries hospitalières... Et l'allaitement au biberon prive le nouveau-né des éléments vitaux que le lait maternel apporte. Sauf si on lui administre le contenu d'un écouvillonnage de la filière maternelle, suggèrent certains auteurs... Conclusion: pour l'enfant, la voie par laquelle il naît est aussi importante que la façon dont on l'alimente... ■■

J.-M. M.

Source: JAMA Pediatrics, on line 11/1/2016, via HealthDay News

Traiter la perte de mémoire : que fera le **BPN14770** ?

Un traitement expérimental susceptible d'améliorer la mémoire est en cours d'évaluation de sa sécurité dans un essai thérapeutique de phase 1 : le BPN14770, développé par le Laboratoire Tetra Discovery Partners, avec le soutien financier du *Blueprint Neurotherapeutics Network* des NIH, un programme conçu pour assister la découverte et le développement de traitements neurologiques innovants. C'est la première molécule du programme à entrer en phase 1.

Le BPN14770 est passé du stade expérimental (préclinique) au stade clinique et les partenaires du programme attendent beaucoup de ce premier essai clinique, dans lequel sont impliquées deux agences sanitaires des NIH : le *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) et le *National Institute on Aging* (NIA).

Cette molécule est la première dans sa classe thérapeutique : un *phosphodiesterase 4D negative allosteric modulator* (PDE4D-NAM). Comme le précise le laboratoire, la phosphodi-estérase 4D (PDE4D) est une enzyme qui joue un rôle dans l'établissement de connexions entre cellules cérébrales. Ainsi, bloquer la PDE4D augmente l'activité de l'AMP cyclique, facteur protéique qui stimule l'apprentissage et la mémoire. Il existe déjà un autre type d'inhibiteur de la PDE4, le rolipram, dont on a montré qu'il améliore les performances cognitives sur un modèle souris de maladie d'Alzheimer, d'AVC et de traumatisme crânien. Bien que le rolipram se soit montré efficace sur l'animal, il n'est pas utilisé en tant que traitement du fait de sérieux effets secondaires. Le BPN14770 pourrait être un traitement de la démence et de la maladie d'Alzheimer avec moins d'effets secondaires possibles que le rolipram. L'étude de phase 1 testera la sécurité et la pharmacocinétique de la molécule de BPN14770 chez 48 volontaires sains. Si sa sécurité est avérée, la seconde phase explorera son impact sur la mémoire à long terme et divers aspects des fonctions cognitives.

Le principe du réseau *Blueprint Neurotherapeutics* du NIH est de faire se rencontrer des scientifiques et des équipes de R et D pharmaceutique pour accélérer le processus permettant à une molécule d'entrer en essais cliniques, « de la paille au lit du patient ». Les NIH leur donnent accès à des experts qui les conseillent lors du développement de nouvelles molécules. La maladie d'Alzheimer est une des cibles prioritaires de ce programme. Le NINDS est le principal soutien à la recherche sur le SNC et le cerveau, c'est à la fois un organisme de recherche fondamentale des connaissances et de recherche appliquée au soulagement des maladies neurologiques. ■■

J.-M. M.

© disq / Fotolia.com

Source : www.nih.gov, www.ninds.nih.gov,
<http://neuroscienceblueprint.nih.gov/bpdrugs/>

BRÈVES

Cigarettes: le paquet neutre

Les premiers paquets neutres de cigarettes et produits du tabac sont apparus le 20 mai, conformément au décret du Journal officiel du 22 mars, suite à la loi de modernisation du système de santé du 26 janvier. Les conditionnements et les emballages des cigarettes et du tabac à rouler en France auront une seule couleur (vert foncé). La mention de la marque et, le cas échéant, de la dénomination commerciale peuvent figurer une seule fois sur la face avant et sur le dessus et le dessous du conditionnement et de l'emballage extérieur des cigarettes et du tabac à rouler et sur la face avant, sur la face arrière et à l'intérieur du rabat ou sur le couvercle pour le tabac à rouler dont le conditionnement ou l'emballage extérieur est une pochette ou est de forme cylindrique. Le suremballage de l'unité de conditionnement et de l'emballage extérieur de cigarettes ou de tabac à rouler est clair, transparent et non coloré. Les produits du tabac non conformes seront encore livrés aux débitants jusqu'au 20 novembre, puis tous les emballages non conformes seront interdits à partir du 1^{er} janvier 2017.

Accord de l'EMA pour un anticancéreux français

Le laboratoire pharmaceutique français Servier a reçu un avis favorable de la Commission des médicaments à usage humain (CHMP) de l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour un nouveau traitement du cancer colorectal métastatique (CCRM) réfractaire, association fixe de trifluridine (FTD) et de tipiracil (TPI), sous le nom de Lonsurf®. Agrément basé sur les résultats de l'étude thérapeutique RECURSE, il marque l'entrée de Servier dans le domaine des tumeurs solides. L'étude RECURSE de phase 3 contre placebo a évalué l'efficacité et la tolérance de Lonsurf® associé à des soins de support par rapport à un placebo également associé à des soins de support chez 800 patients atteints d'un CCRM antérieurement traité. L'essai a satisfait au critère de principal attendu, l'amélioration statistiquement significative de la survie globale (SG). Les résultats avaient montré une réduction de 32 % du risque de décès vs les seuls soins de support (RR = 0,68 ; IC : 0,58 à 0,81 p < 0,001) et une amélioration de la médiane de SG : 7,1 avec Lonsurf® vs 5,3 mois avec le placebo. Ces données ont été présentées au congrès de l'ASCO.

Alcoolisation fœtale: paradoxal retard français dans sa prise en charge

Dans un communiqué, l'Académie nationale de médecine rappelle qu'en France le syndrome d'alcoolisation fœtale, ou SAF (plus correct que l'appellation ancienne alcoolisme fœtal) concerne au moins 1 % des naissances, soit quelque 8000 cas/an ; près de 500 000 Français souffriraient à des séquelles de l'alcoolisation gravidique.

Pourquoi ce rappel ? Paradoxalement, le pays où parut au siècle dernier l'observation princeps de ce syndrome (Dr Paul Lemoine) accuse un retard dans la gestion globale du SAF, avertit l'Académie, par comparaison avec les pays anglosaxons, s'agissant de l'information, de la prévention et de la prise en charge de troubles constituant *un véritable fléau de santé publique et un problème de société* qu'il faut mieux gérer. Constats.

- La consommation de boissons alcooliques pendant la grossesse augmente de manière inquiétante malgré les recommandations de l'Académie en 2006 - un peu oubliées sans doute.
- Plus de 20 % des Français ignorent les risques de l'alcoolisation fœtale... celle des femmes enceintes.
- L'augmentation des troubles du comportement chez les enfants d'âge scolaire et les adolescents (avec prolongement chez l'adulte) suggère une relation avec l'usage de substances toxiques au cours de la grossesse... dont l'alcool. Rappel à ce propos : l'exposition à l'alcool aux périodes embryonnaire et fœtale modifie des structures cérébrales, d'où survenue ultérieure de troubles cognitifs, du comportement et de la mémorisation, voire de tendances addictives dans lesquelles intervient aussi l'épigénétique.

Conclusion : en l'absence de traitement curatif, ne reste que la prévention est la seule solution. Or dit l'Académie, on peut mettre en œuvre une prévention efficace. Il est désormais possible de détecter l'alcoolisation maternelle et fœtale.

- Des auto-questionnaires ont été validés, ils permettent, sans culpabiliser les femmes, de surmonter le risque du déni et de ses conséquences.



- De nouveaux biomarqueurs, plus indicatifs d'une alcoolisation chronique *versus* l'alcoolémie, qui n'est qu'un instantané ne traduisant pas cette chronicité. Différant des tests biologiques classiques (gamma-GT, tests hépatiques, hémogramme) indirects, peu sensibles et peu fiables et donc à risque de faux positifs, ils dosent la concentration sérique des métabolites de l'éthanol. Par analyse capillaire chez la mère et par dosage dans le méconium du fœtus, ils permettent de repérer *a posteriori* avec précision et fiabilité une alcoolisation maternelle, avec consommation excessive et répétée.
- Dernier point, dit l'Académie : il faut aussi prendre en compte les progrès de l'IRM chez le fœtus *in utero* et le nouveau-né, qui permet de localiser les zones cérébrales *impactées* par l'intoxication alcoolique.

Le risque d'alcoolisation fœtale doit être considéré, au même titre que le diabète gestationnel et l'HTA gravidique, comme une maladie chronique de la grossesse, qui impose une prise en charge globale, médicale mais aussi biologique, afin de protéger le fœtus.

Les biomarqueurs de l'alcoolisation sont une des clés de cette prise en charge – comme cela se fait ailleurs : « Leur large utilisation témoignerait de la volonté des pouvoirs publics de lutter avec détermination contre un fléau qui atteint la fraction sensible, vulnérable et sans défense de la société : le fœtus », conclut l'Académie nationale de médecine... qui souhaite que le SAF soit un jour déclaré Grande Cause Nationale de santé.

Impossible en France ? ■■

J.-M. M.

Cancers gynécologiques: recueil de cellules par lavage utérin

Le lavage d'une cavité anatomique permet de recueillir des cellules de tumeurs cancéreuses. C'est ce que permet le lavage de la cavité utérine pour recueillir des cellules de néoplasmes de l'ovaire ou de l'endomètre à un stade précoce, expliquent des équipes de l'Université de Vienne (Autriche), de l'Université Johns Hopkins (Baltimore) et de l'Université La Charité de Berlin,

Le cancer de l'ovaire et le cancer de l'endomètre sont souvent diagnostiqués à un stade avancé, d'où un taux de survie assez pauvre. Or, disent les auteurs, on dispose de preuves croissantes que ces organes peuvent s'exfolier et relarguer des cellules. Ce travail collaboratif décrit l'intérêt du lavage de la cavité utérine pour détecter des cellules cancéreuses exfoliées à un stade précoce. La technique a été pratiquée pour obtenir

des échantillons cellulaires chez 65 patientes (30 avaient un cancer de l'ovaire, 5 un cancer de l'endomètre, 3 d'autres types de tumeur maligne et 27 étaient porteuses de lésions bénignes gynécologiques). Sur les échantillons recueillis par lavage et les prélèvements tissulaires correspondants ont été recherchées des mutations somatiques par séquençage de nouvelle génération (*next generation sequencing/NGS*) et analyse singleplex.

Le lavage de la cavité utérine a permis d'obtenir suffisamment d'ADN chez toutes les patientes. Des mutations, principalement de TP53, ont été identifiées sur 60 % des échantillons recueillis chez les patientes porteuses d'un cancer de l'ovaire en utilisant le NGS. L'analyse singleplex des mutations précédemment déterminées sur les tissus tumoraux a permis une identification supplémentaire chez 6 patientes. Dans l'ensemble, chez 24 (80 %) des 30 patientes avec cancer de l'ovaire, des mutations spécifiques ont pu être identifiées, y compris chez une patiente

porteuse d'un cancer occulte.

Les 5 échantillons obtenus par lavage chez les patientes porteuses d'un cancer endométrial étaient porteurs de mutations. Chez les 27 patientes porteuses de lésions bénignes, 8 (29,6 %) testaient positives pour des mutations dont 6 (75 %) sur le gène K-RAS.

Ainsi la détection d'un cancer de l'ovaire et d'un cancer de l'endomètre, et même un cancer occulte de l'ovaire, est réalisable, se révélant un outil prometteur de diagnostic précoce. Les auteurs suggèrent que cette technique soit réalisée à titre de dépistage précoce à diverses périodes de la vie, notamment chez des femmes à risque, voire être comparée avec le frottis en phase liquide. ■

J.-M. M.

Source: Maritschnegg E, et coll., Lavage of the Uterine Cavity for Molecular Detection of Müllerian Duct Carcinomas: A Proof-of-Concept Study, J Clin Oncol., 2015;doi:10.1200/JCO.2015.61.3083. online before 9/11/2015.

BRÈVES



L'autre problème de Lyme: les biofilms

L'échec de l'antibiothérapie de la maladie de Lyme pour éliminer son agent, *Borrelia burgdorferi*, est dû à une tactique de celle-ci: la formation de « colonies » sous forme de biofilms, qui permet aux bactéries de se protéger des antibiotiques. Ceci explique les rechutes de la maladie après arrêt de l'antibiothérapie. C'est une étude de l'Université de New Haven (Eva Sapi, et coll., Biology and Environmental Sciences), parue dans l'*European Journal of Microbiology and Immunology*, qui indique que la formation des bactéries en biofilms les rendrait jusqu'à mille fois plus résistantes aux antibiotiques. La formation de bactéries en biofilms n'est pas de découverte récente, certes, mais ici elle devrait amener à définir une nouvelle façon de traiter la maladie de Lyme, surtout chez des patients qui semblent avoir une *maladie persistante*, malgré un traitement antibiotique prolongé, expliquent les auteurs. C'est aussi l'opportunité de contrarier l'antibiorésistance de *B. burgdorferi* en adoptant de nouvelles cibles de traitement.

Source: communiqué de presse de l'Université de New Haven (Connecticut).

Angor et infarctus entre 30 et 40 ans: pensez HF



Chez un sujet qui développe un angor ou est frappé d'un infarctus du myocarde entre 30 et 40 ans, la question se pose d'une hypercholestérolémie familiale (HF) sous-jacente, facteur de risque cardiovasculaire majeur, héréditaire, auquel peuvent s'ajouter les facteurs de risque *classiques*. Même quand ce patient semble en bonne santé (*healthy*), mange bien et est mince est en forme, ajoute le Pr Sarah de Ferranti, enseignante de cardiologie pédiatrique à la Faculté de médecine de Harvard et directrice de la prévention cardiologique à l'Hôpital des Enfants de Boston. S. de Ferranti et coll. attirent l'attention sur la prévalence de l'HF, de grandes études de population ont montré qu'elle concerne 1 Américain sur 250 et non 1 Américain sur 500 (notion ancienne), taux qui est sans doute le même (au moins) en Europe. Ce résultat épidémiologique chiffré basé sur de larges séries de patients, l'équipe de Boston juge nécessaire de le compléter par une étude génétique à partir de 12 ans.

Source: *Circulation* (American Heart Association), 2016;doi:10.116/CIRCULATIONAHA.115.018791.



Candidat-vaccin anti-VIH français: demande d'AMM en 2018?

Le Laboratoire Biosantech (Sophia Antipolis) a publié récemment dans la revue scientifique *Retrovirology* les résultats détaillés de l'étude de phase 2a de son candidat vaccin contre le VIH. Cette publication avait pour objectif principal la démonstration de la réduction du rebond virémique et de celui de l'ADN pro-viral après arrêt momentané de la trithérapie antirétrovirale (ART).

Biosantech (PDG: Corinne Treger) a publié des résultats détaillés de son étude d'efficacité clinique de phase 2a de son candidat vaccin anti-VIH contenant la protéine Tat Oyi et élaboré sur la base des travaux du Pr Erwann Loret.

Ces premiers résultats démontrent en particulier que 3 patients sont toujours au statut d'ADN viral non détectable, 24 mois après injection du candidat-vaccin. Devant ce résultat, Biosantech a annoncé son intention de passer à une évaluation à grande échelle au cours de l'année 2016 afin d'être en mesure de solliciter une autorisation de mise sur le marché (AMM) dès le second semestre 2018.

Ces résultats démontrent, à la dose injectée de 33 µg, une efficacité globale de voisine 60 % à réduire les rebonds de l'ARN et celui de l'ADN pro-viral après arrêt momentané du traitement chez des patients infectés par le VIH. Ils démontrent également et surtout, que trois patients sont toujours en ADN viral non détectable, 24 mois après injection du candidat vaccin. Ces résultats confirment ainsi l'effet bénéfique du candidat vaccin sur la virémie mais aussi sur les cellules réservoirs du virus. Ainsi, associé à la trithérapie dans le but d'éliminer les cellules réservoir, il pourra guérir définitivement du Sida les personnes infectées.

Les analyses des événements indésirables graves (EIG) pendant l'étude montrent des taux de notification similaires entre le

groupe des vaccinés et le groupe témoin. Des résultats conformes au profil de tolérance favorable observé au cours des 12 mois de surveillance active de l'étude d'efficacité précédente conduite à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (APHM).

«Le fait de disposer d'un vaccin qui vient en complément des antirétroviraux, est une avancée majeure dans la cure anti VIH», indique le Dr Isabelle Ravaux, principale investigatrice de l'essai à l'APHM. Le programme d'étude clinique d'efficacité des phases 1 et 2a du candidat-vaccin anti-VIH de Biosantech a été mené grâce à plus de 50 volontaires de la région marseillaise. Biosantech va déposer une demande d'essai en phase 3 de son candidat-vaccin et, sous réserve de l'approbation des autorités réglementaires et des résultats à grande échelle, un premier vaccin contre le VIH pourrait être disponible dès le second semestre 2018.

Un vaccin qui répondra à des besoins médicaux urgents encore non satisfaits dans les régions à forte incidence épidémiologique du monde et aussi au besoin d'éradication des réservoirs du VIH chez les patients sous antirétroviraux. C'est ce qu'espère toute l'équipe de Biosantech impliqué dans ce projet... ■■

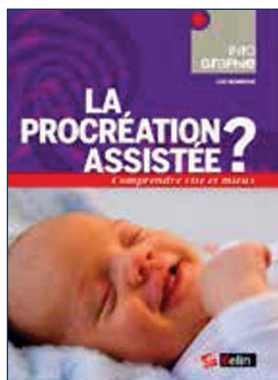
J.-M. M.

Source: Laboratoire Biosantech.
www.biosantech.org

LIVRES

La procréation assistée ? Comprendre vite et mieux

Chiffres clés, enjeux, débats : tout pour se faire une opinion. Envie de comprendre, besoin de savoir ? Faites-vous votre opinion sur l'assistance médicale à la procréation (AMP) et sur les questions de société qu'elle suscite. On y trouve les questions et les réponses. Quelles sont les techniques d'AMP et qui peut en bénéficier, en France et dans le monde ? L'AMP et d'autres techniques médicales récentes permettent-elles de choisir certaines caractéristiques d'un enfant à naître ? Faut-il autoriser les recherches sur les embryons - et si on les autorisait, à quoi serviraient-elles ? Don de spermatozoïdes ou d'ovules, mères porteuses, accès de l'AMP aux couples d'hommes ou de femmes, en quoi l'AMP fait-elle bouger les modèles familiaux ?... Et enfin : quelles sont les législations



concernant l'AMP, qui décide de ce qui est éthique ou ne l'est pas ? On découvre

les réponses à ces questions et à bien d'autres, grâce à des doubles pages résolument graphiques et faciles à lire. Décryptez sans parti-pris les débats et la diversité des opinions à travers des entretiens avec des experts et des personnalités de premier plan. L'auteur, journaliste scientifique chevronnée qui a recueilli les données

jalonant le livre directement auprès des spécialistes du sujet en France. Préface de Pierre Jouannet, professeur émérite à l'Université Paris-Descartes, ancien responsable du service de biologie de la reproduction à l'Hôpital Cochin (Paris). ■■

Lise Barnéoud. Collection Infographies.
www.editions-belin.com

Les Recos Vidal

Depuis plus de 10 ans, les Recos Vidal synthétisent les recommandations thérapeutiques françaises et internationales sous forme d'arbres décisionnels. Les médicaments sont indiqués pour chaque pathologie. Ce fonds, enrichi et mis à jour chaque mois, fait l'objet de la publication d'un livre tous les 2 ans. La 6^e édition vient de paraître : 185 fiches pratiques, du diagnostic aux traitements, pour 185 pathologies et situations médicales, ville et hôpital. Cette nouvelle édition comporte 10 nouvelles Recos, et une actualisation de l'ensemble des fiches pratiques, dont certaines majeures : prise en charge du mésusage de l'alcool, place des nouveaux anticoagulants oraux, nouveaux traitements de l'hépatite C, infections urinaires... Validées



par un Comité scientifique et structurées sous forme de fiches, les Recos regroupent l'essentiel à savoir pour se former ou s'informer sur les prises en charge recommandées pour une prescription fondée sur les preuves. La nouvelle édition 2016 comporte les 10 nouvelles Recos suivantes : agranulocytose, arthrite juvénile idiopathique, hypercalcémie, hypotension orthostatique, Infections urinaires masculines, Insuffisance rénale aiguë, leucémie aiguë, leucémie myéloïde chronique, phobie sociale, médicaments et fonction rénale.

En librairies spécialisées depuis le 16 septembre 2015. ■■

Format de poche 110 x 190 mm -
2800 pages - Quadrichromie.
www.vidalfrance.com

AGENDA

juin-novembre 2016

JIB / SNBH 2016

22-24 juin 2016

Paris/Porte de Versailles

www.jib-sdbio.fr

Société française d'hygiène hospitalière

1-3 juin 2016

Nantes

www.sf2h.net

EAACI/European Allergy & Clinical Immunology

11-15 juin 2016

Vienne (Autriche)

www.eaaci2016.org

Les perturbateurs endocriniens

21-22 juin 2016

Paris/Institut Pasteur

<https://www.anses.fr>

ASCO/American society of clinical oncology

3-7 juillet 2016

Chicago

www.am.asco.org

Frontiers of retrovirology

12-14 septembre 2016

Erlangen (Allemagne)

www.retrovirology.biomedcentral.com

ECTRIMS/Sclérose en plaques Europe

14-17 septembre 2016

Londres

www.ectrims-congress.eu

EFLM-UEMS Laboratory medicine at the clinical interface

21-24 septembre 2016

Varsovie

www.eflm-uems.warsaw2016.eu

EAACI-FAAM/ Food allergy & anaphylaxis

13-15 octobre 2016

Rome

www.eaaci-faam.org

Symposium Infectious diseases in children

19-20 novembre 2016

New York

www.IDC/NewYork.com



Le BOP pour mobiliser rapidement les CSH

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), souvent indispensable au traitement des néoplasies, nécessitait leur collecte au niveau de la moelle osseuse localisée dans la crête iliaque des os pelviens. Afin d'éviter ce geste invasif, de nombreuses études ont été réalisées dans le but de trouver un moyen pour mobiliser les CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique.

Cette mobilisation a tout d'abord été induite par des injections répétées sur 3 à 4 jours de facteurs de croissance tels que le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), dont l'efficacité était cependant contrecarrée par des effets secondaires parfois importants, telles que des douleurs osseuses, une augmentation du volume de la rate et d'autres altérations du microenvironnement hématopoïétique. Par cette stratégie, le délai nécessaire à la mobilisation des CSH est lié au mode d'action indirect du G-CSF, qui entraîne la production, par les granulocytes, de protéases qui clivent l'interaction entre la chimiokine mobilisatrice CXCL12 et son principal récepteur, le CXCR4.

Afin de pallier à ces difficultés, des solutions alternatives ont été recherchées. C'est ainsi que l'injection d'une dose unique d'AMD3100 (plerixafor/mozobil), une petite molécule antagoniste du récepteur CXCR4, a été proposée. Son efficacité s'est révélée particulièrement intéressante mais elle devait toujours être associée au G-CSF, car l'AMD3100 restait peu ou pas efficace en son absence. Le

problème restait donc entier... jusqu'à la découverte par une équipe australienne d'une autre petite molécule, dénommée BOP (N-(Benzene-sulfonyl)-L-prolyl-L-O-(1-Pyrrolidinylcarbonyl) tyrosine, dont l'efficacité, à dose unique sur la souris, est remarquable en termes de rapidité et de sélectivité.

Dans un article publié dans *Nature Communication* en mars, l'équipe de Susan Nilsson montre qu'en association avec

Un antagoniste des intégrines $\alpha_9\beta_1/\alpha_4\beta_1$, les extrait de leur sanctuaire médullaire vers le sang périphérique.

l'AMD3100, le BOP présente une efficacité 3 à 4 fois supérieure à celle du G-CSF. Cette mobilisation fait intervenir une inhibition des intégrines $\alpha_9\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$ (VCAM), et plus particulièrement les intégrines $\alpha 9\beta 1$, dont le rôle dans la rétention des CSH dans la moelle osseuse est bien connu. En utilisant un antagoniste fluorescent de ces intégrines, les auteurs ont également montré que la zone proche de l'os (endoste), où sont préférentiellement nichées les CSH primitives, était particulièrement impliquée dans le processus de mobilisation. Ils ont

ensuite mis en évidence que la combinaison BOP/AMD3100, à dose unique, permet la mobilisation de CSH humaines en un temps record (environ 1 heure) sur la souris humanisée immunodéficiente, contrairement au G-CSF administré seul, dont l'efficacité dans ce modèle était beaucoup plus faible.

La mise en évidence de l'efficacité du BOP dans la mobilisation des CSH humaines hors de la moelle osseuse sur la souris est un premier pas vers un essai clinique de phase 1 chez l'Homme. Cet essai devrait permettre d'améliorer le recueil des CSH en vue de greffes et ce, de façon plus rapide, moins invasive et avec moins d'effets secondaires. Ces résultats pourraient également présenter un intérêt dans le traitement des néoplasies où, en les gardant en quiescence, le nichage des cellules souches leucémiques/cancéreuses dans la moelle osseuse les protège de l'effet des chimiothérapies.

Ainsi, en inhibant la liaison des cellules souches avec le stroma médullaire via les intégrines $\alpha_9\beta_1/\alpha_4\beta_1$ et le couple CXCL12-CXCR4, ces molécules mobilisatrices pourraient les déloger de leur sanctuaire, les mettre en cycle et les rendre alors sensibles aux chimiothérapies. Il restera cependant à trouver un équilibre entre la mobilisation des cellules souches leucémiques et des cellules souches normales hors de leurs niches protectrices. ■■

Cao B, et coll. *Nat Commun.* 2016 Mar 15;7:11007. doi: 10.1038/ncomms11007.

Si l'incompatibilité de greffe devenait compatible

Dans les années 1970, malgré un protocole d'immunosuppression sévère et une ablation de la rate riche en lymphocytes B, les premières greffes rénales dites *ABO-incompatibles* (AOBi), c'est-à-dire une greffe entre un receveur et un donneur dont le groupe sanguin n'est pas compatible, se sont soldées par un taux de rejet important. C'est l'avènement, au cours des années 2000, du rituximab, un anticorps dirigé contre la molécule CD20 exprimée par la plupart des cellules B, qui a permis d'améliorer

de façon très significative les résultats des greffes AOBi.

Depuis, les protocoles de désensibilisation, c'est-à-dire par déplétion du plasma du receveur en anticorps (dont les anticorps HLA) par des échanges plasmatiques (plasmaphérèse) ou par des techniques d'immuno-adsorption sur colonne permettant une approche plus spécifiquement ciblée sur les anticorps HLA, ont grandement amélioré les résultats de ce type de greffe. Cette désensibilisation ou *mise en compatibilité pré-greffe* doit être également suivie

par des traitements post-greffes visant à empêcher ces anticorps de réapparaître. De tels protocoles sont donc très lourds, non seulement pour le patient, en particulier en termes de durée de désensibilisation et du risque accru de cancer lié à cette immunosuppression, mais également pour l'hôpital, en raison de leurs coûts importants. De ce fait, malgré son intérêt et la possibilité récente de greffer des reins à partir de donneurs vivants, cette technique reste encore trop peu développée aujourd'hui et les études publiées ne permettent pas

d'établir le bénéfice d'un tel protocole. Ceci est en particulier le cas pour les patients difficilement transplantables en raison de la présence d'une forte quantité d'anticorps anti-HLA et par manque de greffons compatibles. L'intérêt de l'étude américaine qui vient d'être publiée en mars 2016 dans le *New England Journal of Medicine* par Orandi BJ et coll. est d'être une étude multicentrique (22 centres dont 5 centres avec un fort recrutement) avec un nombre important de cas (plus de mille patients). Dans cette étude, les auteurs ont comparé le bénéfice de survie de patients ayant reçu une greffe de rein HLA incompatible à partir d'un donneur vivant après désensibilisation avec celle de deux groupes de patients-contrôles : les uns, placés sur une liste d'attente pour une greffe ou ayant reçu une greffe d'un donneur décédé, les autres, placés sur une liste d'attente uniquement.

Les résultats montrent clairement que la greffe HLAi à partir de donneurs vivants augmente la survie des patients greffés par rapport à ceux qui attendent des greffes compatibles.

En effet, 8 ans après une greffe, 76 % de ceux qui avaient bénéficié d'une greffe HLAi et qui avaient subi une désensibilisation sont toujours en vie par rapport à 63 % pour ceux qui avaient bénéficié d'un greffon compatible et à 44 % pour ceux qui étaient toujours sur une liste d'attente. Bien que les auteurs fassent apparaître un certain nombre de limitations à leur étude, et en particulier concernant l'hétérogénéité des techniques utilisées dans les différents centres pour doser les anticorps, désensibiliser les patients et évaluer la persistance de cette désensibilisation au cours des 8 années de l'étude, de tels résultats offrent un espoir aux patients dont l'espérance de vie est très limitée.

Cet espoir reste fragile car il faudra démontrer l'efficacité de tels procédés sur le long terme, mais il est réel, comme en témoigne cette étude ainsi que les résultats de différents hôpitaux français qui les pratiquent déjà depuis quelques années. De même, et de façon très intéressante, des transplantations ABOi d'autres organes, en particulier de foie, mais également de poumons et de cœur, ont déjà été réalisées avec succès. De telles réussites pourraient remettre en question la définition même du terme *incompatible* (du préfixe *in*, privé de, et du verbe latin *compatior*, souffrir avec, compatir), puisqu'il devient vraisemblable qu'à l'avenir, on puisse, non plus *souffrir* avec mais *vivre* avec cette incompatibilité... ■

Orandi BJ, et coll. *N Engl J Med*. 2016 Mar 10;374(10):940-50. doi: 10.1056/NEJMoa1508380.

Quand la machine recrée l'Homme

Depuis déjà un certain nombre d'années, de plus en plus d'articles publiés dans la presse grand public et dans la presse scientifique vantent les mérites de telles ou telles machines à réparer ou à... augmenter les hommes ! Parmi ces drôles de machines, citons pêle-mêle : prothèses, exosquelettes, implants cérébraux, yeux bioniques, organes artificiels (cœur, main, jambe...) dont les *imprimantes 3D* sont les mères substitutives de fabrication additive. On pensait que ces inventions étaient pour demain... mais le futur semble nous avoir déjà rattrapés, comme nous le décrit un article qui vient d'être publié dans *Nature Biotechnology* de mars 2016.

Une équipe américaine rapporte pour la première fois, l'impression d'un tissu biologique à partir d'un hydrogel alvéolaire, qui permet aux cellules imprimées de tenir dans une structure rigide. Cette structure sera ensuite progressivement biodégradée *in vivo* grâce à l'incorporation de polymères synthétiques dans l'hydrogel. Cet hydrogel contient entre autres de la gélatine, liquide à 37 °C mais solide en dessous de 25 °C, du fibrinogène qui apporte de la stabilité au gel et un environnement facilitant l'adhésion et la prolifération cellulaire, de l'acide hyaluronique et du glycérol qui apportent une uniformité au gel.

Cet hydrogel peut avoir différentes tailles et revêtir différentes formes grâce à un patron de l'organe à reproduire fabriqué au

millimètre près grâce à un scanner. Enfin, l'incorporation de micro-canaux dans la structure permet des échanges gazeux et nutritifs afin de conserver les cellules en vie. L'équipe montre également que les cellules induites à se différencier peuvent être imprimées et donner alors naissance à des

Des tissus complexes, structurés et vascularisés peuvent être générés par bio-impression 3D.

tissus spécialisés tels que l'os, le cartilage et les muscles squelettiques, le défi étant d'imprimer les cellules au bon endroit de la structure 3D et de les conserver en vie le temps de l'impression avant la mise en culture et l'implantation *in vivo*.

Les auteurs rapportent qu'ils ont pu ainsi reconstruire des tissus spécialisés dont l'analyse histologique met en évidence des structures organisées, vascularisées et non nécrosées. Ce travail est important conceptuellement car il prouve que la génération de tissus complexes est possible *in vitro*, mais il ouvre la porte à de nécessaires futures études où il faudra

ensuite veiller à ce que ces ensembles de tissus répondent à la définition d'un organe, c'est-à-dire qu'ils concourent à la fourniture d'une fonction physiologique. Ainsi, grâce aux progrès de la science et aux avancées technologiques qu'il a lui-même développé, *Homo sapiens* deviendra également, lentement mais sûrement, un *homme bionique*. Mais jusqu'où pourra/devra-t-on aller ? Ne joue-t-on pas aux apprentis sorciers ? Quand on assiste avec étonnement à la victoire du programme informatique conçu par Google sur le champion du monde sud-coréen du jeu de go, on peut se poser des questions plus que légitimes, en particulier sur le risque que l'intelligence artificielle de la machine créée par l'Homme ne s'émancipe et le dépasse. Si l'astrophysicien Stephen Hawking redoute avec un certain pessimisme que cela ne mette fin à l'humanité, ce serait sans compter sur ce « petit supplément d'âme » qui fait que l'Homme est ce qu'il est... Gardons-nous cependant d'un trop grand angélisme et tout en restant confiant, cultivons notre esprit critique et interrogeons-nous, au cas par cas, du bien-fondé de telles métamorphoses... ■

Kang HW, et coll. *Nat Biotechnol*. 2016 Mar;34(3):312-9. doi: 10.1038/nbt.3413. [Epub 2016 Feb 15].

Automatisation du laboratoire de bactériologie

François Jehl^a



AVANT-PROPOS

Automatisation du laboratoire de bactériologie : il y a 3 décennies, accoler ces trois mots faisait passer leur auteur pour un doux rêveur, un utopiste, tant semblait complexe cette discipline par la diversité de la nature des prélèvements, des moyens à mettre en œuvre pour l'isolement des bactéries, leur identification et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques. Le technicien de laboratoire et le biologiste mettaient plusieurs années avant de la maîtriser et seule une longue expérience était garante de leur expertise, irremplaçable, et jalousement transmise de génération en génération. Force est de constater qu'en 2016, la bactériologie est passée de l'ère artisanale des boîtes de Pétri, des öses en platine, de l'identification biochimique en galeries de tubes et du mirage des hémocultures à la lampe, à celle de la biologie moléculaire, de la spectrométrie de masse, des chaînes automatisées de mises en culture avec ou sans « étuves

intelligentes », des colorateurs de Gram et autres cytomètres et des automates d'antibiogrammes couplés à des systèmes dits experts. Bien qu'en- core incomplète, gageons que cette automatisation deviendra globale dans les prochaines années à venir. Pour autant les microbiologistes, n'y perdront pas leur âme ni leur spécificité incontournable à la prise en charge des pathologies infectieuses

Dans ce numéro spécial, Marie-Laure Joly-Guillou nous fait bénéficier de son « vécu » précieux de cette évolution, dont l'historique commence par les mini- galeries et les automates d'hémocultures, et dont les conséquences en termes d'organisation et sur le plan humain sont considérables. Il n'est, et ne sera, pas facile pour tout le monde de faire le deuil de la bactériologie traditionnelle. Dans le même ordre d'idée, Gilbert Greub analyse les avantages et les limites des différents systèmes d'incubateurs intelligents disponibles, tous associés à un système d'imagerie digitalisée automatisée ouvrant la porte à la télébactériologie.

Eterne Twizeyimana nous présente de façon très détaillée, certainement très utile face à un choix, les avantages et les inconvénients respectifs de trois automates réalisant l'analyse de bactériologie la plus fréquente : l'examen cyto-bactériologique des urines.

Philippe Riegel aborde ce qui est certainement un des progrès récents les plus décisifs de la micro-

^a Plateau Technique de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1-3, rue Koeberlé
67000 Strasbourg

* Correspondance
* jehl@unistra.fr

biologie médicale : l'identification bactérienne par spectrométrie de masse. La possibilité de connaître, dans les minutes suivant l'isolement sur gélose, l'identité d'une bactérie dont il faut lire l'antibiogramme a certainement contribué à l'amélioration de la prise en charge des infections.

Jean Louis Hermann nous rappelle comment la biologie moléculaire appliquée à la bactériologie a bénéficié de l'apport de la virologie en ce domaine. Les progrès sont considérables, même s'il reste encore un peu de chemin à parcourir en termes d'automatisation.

Claudine Quentin-Noury dans une revue quasi exhaustive, passe en revue toutes les facettes de l'étude au quotidien de la relation antibiotiques-bactéries *in vitro* aboutissant, *in fine*, à l'automatisation de l'antibiogramme, examinant dans le détail les avantages/inconvénients et pièges des nombreuses possibilités existantes.

Un grand merci à tous ces auteurs d'avoir pris le risque d'accepter une tâche rédactionnelle difficile, nécessitant du recul, sur des sujets en plein devenir, très évolutifs et pour lesquels le consensus n'est pas toujours de mise.

Sommaire thématique

- Automates et uroculture : la cytologie urinaire..... **p. 25**
- Méthodes moléculaires et automatisation en microbiologie.... **p. 35**
- Automatisation de l'identification bactérienne..... **p. 39**
- Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie..... **p. 49**
- Avantages et limites des différents systèmes d'automatisation en bactériologie..... **p. 61**
- Impact de l'automatisation sur l'organisation d'un laboratoire de bactériologie **p. 67**
- QCM **p. 74**

La coordination de ce dossier a été assurée par le Pr François Jehl, Plateau Technique de Microbiologie, Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Automates et uroculture : la cytologie urinaire

Eterne Twizeyimana ^{a,*}

RÉSUMÉ

L'examen cyto-bactériologique des urines (ECBU) reste l'analyse bactériologique la plus prescrite dans un laboratoire de biologie médicale. L'ECBU est capital pour poser un diagnostic initial ou un suivi d'une infection du tractus urinaire ou de pathologies néphrologiques non infectieuses. Elle comporte deux parties indissociables : la cytologie urinaire et la culture sur milieux solides. La cytologie peut être réalisée de façon manuelle ou de façon automatisée. Cet article traite essentiellement de trois automates de cytologie urinaire les plus rencontrés sur le marché français en décrivant succinctement leurs principes et performances analytiques. La cytologie manuelle présente généralement des résultats semi-quantitatifs et une relative variabilité inter-opérateur. Elle consomme du temps technicien. L'automate de cytologie urinaire permet de rendre un résultat quantitatif, rapide et plus fiable. L'automate permet de standardiser la cytologie urinaire et offre une économie substantielle en temps technicien.

Automate – cytologie urinaire automatisée – microscopie manuelle.

1. Introduction

L'examen cyto-bactériologique des urines (ECBU) reste l'analyse bactériologique la plus prescrite dans un laboratoire de biologie médicale. L'ECBU est capital pour poser un diagnostic initial ou un suivi d'une infection urinaire ou de pathologies néphrologiques non infectieuses. Le **tableau 1**, inspiré de l'article de Block et al [1], rappelle l'intérêt clinique de la cytologie urinaire.

Elle comporte deux parties indissociables : la cytologie urinaire et la culture sur milieux solides. La cytologie peut être réalisée de façon manuelle ou de façon automatisée. Dans cet article, nous allons essentiellement traiter des automates de cytologie urinaire en décrivant succinctement les principes de fonctionnement et les performances analytiques et diagnostiques de chacun des automates disponibles sur le marché. La cytologie manuelle souffre malheureusement d'une imprécision des chiffres rendus (leucocyturie semi-quantitative) et d'une relative variabilité inter-opérateur. Elle a l'inconvénient de consommer du temps technicien et donc d'impacter le budget du personnel du laboratoire hospitalier. L'automate de cytologie urinaire permet de rendre un résultat précis, rapide et plus fiable.

^a Plateau Technique de Microbiologie

Laboratoire de Bactériologie - CNR des *Borrelia*
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1, Rue Koeberlé
67000 STRASBOURG

* Correspondance

eterne.twizeyimana@chru-strasbourg.fr

article reçu le 31 décembre 2015, accepté le 31 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Automation and urinalysis : the urine cytology

The bacterial urinalysis (or urine culture) remains the most prescribed bacteriological analysis in a medical laboratory. The urine culture is essential for making an initial diagnosis or monitoring of a urinary tract infection or noninfectious nephrological diseases. It consists of two inseparable parts: urine cytometry and culture on solid media. Cytology can be performed manually or in an automated manner. In this article, we will deal mainly with three of urine sediment analyzers most encountered on the French Lab market by briefly describing their analytical principles and performance. Manual cytology generally provide semi-quantitative results and a relative inter-operator variability. It also consumes technician time of work. Urine sediment analyzers offers a quantitative result, faster and more reliable. The automated urinalysis enables standardization urinary cytology and offers a substantial saving technician time.

Automate – automated urinalysis – manual microscopic screening.

Trois des automates de cytologie urinaire vont être abordés ici : UF-1000ⁱ de SYSMEX, IQ200[®] d'IRIS DIAGNOSTIC Inc., et SediMax[®] distribué par A.MENARINI France (ou UriSed[®] distribué par I2A).

Les laboratoires de biologie médicale sont équipés, du moins partiellement, d'automates impliqués à différentes étapes du processus analytique. Un examen bactériologique urinaire est le plus souvent indiqué à des fins diagnostiques et comporte des étapes bien définies. Elles sont au nombre de trois : le volet pré-analytique concerne le prélèvement biologique (sa nature, conditions et modalités de prélèvement et d'acheminement au laboratoire dans le milieu conservateur approprié). Pour les urocultures, au sein des laboratoires français, le prélèvement est communément réalisé en tube boraté. La phase analytique comprend l'étude de la *cellularité* du prélèvement et/ou la mise en culture lorsque cela est nécessaire et enfin, le volet post-analytique de l'ECBU comporte le rendu d'un résultat définitif clairement interprété pour le prescripteur clinicien.

2. Les principaux avantages de l'automatisation en bactériologie

L'automatisation de la bactériologie présente de nombreux avantages qui sont bien décrits dans l'article de Martin et al [2]. « L'automatisation d'un laboratoire de bactériologie répond à des impératifs de qualité (standardisation, traçabilité, diminution du risque d'erreur, validation technique) et de

Tableau I – Corrélations entre les éléments urinaires et le contexte étiologique [1].

Éléments urinaires	Contextes cliniques
Hématurie microscopique.	Hématurie intermittente :
	Inexpliquée : asymptomatique.
	Infection du tractus urinaire.
	Lithiase.
	Exercice physique intense (hématurie d'effort).
	Traumatisme.
	Endométriose
	Hématurie permanente :
	Drépanocytose.
	Polykystose rénale.
	Cancers : vessie, rein, prostate.
	Adénome de prostate.
	Glomérulopathie : néphropathie IgA, Syndrome d'Alport, maladie de membranes basales fines.
Leucocyturie.	Infection du tractus urinaire.
	Leucocyturie aseptique :
	Infection urinaire décapitée.
	Contaminations vaginales (leucorrhées).
	Infections urinaires à germes atypiques (mycoplasmes, <i>Chlamydiae</i> spp, tuberculose urinaire).
	Néphropathie interstitielle chronique (lymphocyturie).
	Tumeur urothéliale.
Cellule Épithéliale Rénale (tubulaires et transitionnelles).	Lithiase
	Nécrose tubulaire rénale, pyélonéphrite, syndrome néphrotique.
Cellule épithéliale pavimenteuse.	Contamination vaginale.
Cellules urothéliales anormales.	Tumeurs urothéliales.
	Infections virales (virus JC, BK).
Corps gras ovalaires (dépôts lipidiques intra-cellulaires).	Syndromes néphrotiques
Cylindres :	
-hyalins.	Précipitation de la protéine de Tamm-Horsfall.
-érythrocytaires.	Syndrome néphritique.
-leucocytaires.	Néphrite interstitielle aigue, pyélonéphrite.
-granuleux et cireux.	Lésions tubulaires en phase terminale de l'insuffisance rénale chronique.
-bactériens.	Infection et/ou contamination.
-levures.	Infection ou contamination.
Cristaux :	
-Oxalate de Calcium.	Cristaux les plus fréquents. Indépendants du pH urinaire.
-Acide urique.	Formés dans une urine à pH < 6.
-Phosphates (de Calcium, de Magnésium, ammoniaco-magnésien et calcico-magnésien).	Formés dans une urine à pH > 6.
-Aminoacides.	Trouble métaboliques. (Cystéine, Tyrosine et Leucine).
-Médicamenteux.	Formation tubulaire rénale (= cause potentielle de lésions rénales).
Autres :	
- Spermatozoïdes	Préciser leur présence.
- Mucus	Pas d'intérêt clinique.

productivité en réduisant les tâches répétitives à faibles valeurs ajoutées (tri des prélèvements et des cultures négatives, ensemencement) pour consolider des étapes importantes comme la sélection des colonies par exemple. L'automate est un gage de qualité et offre une meilleure traçabilité de toutes les étapes de l'analyse. Connecté au système informatique du laboratoire, l'automate permet de rendre plus rapidement les résultats en évitant des erreurs de retranscription manuelle. L'automate génère également une économie en temps technicien en consacrant les techniciens à des tâches plus avancées. L'apparition des automates de cytologie urinaire sur le marché français permet de standardiser la cytologie urinaire et de rendre un résultat reproductible. »

3. Les automates de cytologie urinaire disponibles sur le marché français

Nous avons choisi de décrire succinctement trois automates fréquemment rencontrés dans les laboratoires français : l'UF-1000i® (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) distribué par bioMérieux, l'automate iQ®200 ELITE (Iris® Diagnostics Inc, Chatsworth, CA, États-Unis) distribué par Beckman Coulter et l'automate SediMAX (77 ELEKTRONIKA Kft, Budapest, Hongrie) distribué par MENARINI Diagnostics France. L'automate Urised distribué par I2A fonctionne sur le même principe technique que le SediMAX.

3.1. L'automate UF-1000i de SYSMEX

La technique utilisée par l'UF-1000i (figure 1) est basée sur la fluoro-cytométrie en flux automatisée basée sur une technologie de diode laser couplée à la focalisation hydrodynamique et à l'impédancemétrie. L'échantillon est prélevé et acheminé vers une chambre de mesure qui utilise une focalisation hydrodynamique pour assurer une unicité de passage et une lecture de chaque particule devant le faisceau laser ainsi qu'un parfait centrage des cellules et une absence de déformation cellulaire. Une chaîne analytique dédiée analyse seulement les micro-organismes cellulaires présents dans l'urine (chambre BACT), une autre analyse les érythrocytes, les leucocytes et d'autres sédiments urinaires (chambre SED). L'échantillon aspiré est donc séparé en deux par l'intermédiaire d'une vanne d'échantillonnage et transféré dans les deux chambres réactionnelles : 150 µL pour l'analyse des sédiments (SED) et 62,5 µL pour l'analyse des bactéries (BACT). Dans chacune des chambres, une dilution et une coloration avec des sondes fluorescentes

à base de polyméthine (qui se lie spécifiquement aux acides nucléiques) sont effectuées. 435 µL de diluants et 15 µL de colorants sont ajoutés dans la chambre des sédiments et 425 µL de diluants et 12,5 µL de colorants sont ajoutés dans la chambre des bactéries. Les échantillons sont agités et montés en température : les sédiments sont colorés pendant 10 minutes à 35 °C au moins et les micro-organismes pendant 20 minutes à 42 °C au moins. Ensuite, la conductivité de l'échantillon de l'urine est mesurée. Les deux fractions de l'échantillon (SED et BACT) sont aspirées dans le liquide froid de gainage (UF-Sheath). Un tunnel liquide est formé selon un flux laminaire ce qui permet une unicité de passage. Les deux fluides ne se mélangent pas et restent séparés en raison d'une célérité et d'une température différentes. L'automate permet d'analyser au maximum 65 000 particules issues de chaque chambre. Chaque cellule est éclairée par un rayon laser rouge de longueur d'onde stable (635 nm) précisément orienté. Les cellules individuelles sont fluorescentes et diffusent la lumière à différents degrés. La seconde étape de la technique est l'analyse optique qui permet d'étudier les signaux générés par l'automate.

Pour chaque particule, les lumières frontale et latérale émises sont détectées en deux endroits par une photodiode à deux positions (frontale et latérale) puis converties en signaux électriques. L'intensité de la fluorescence (faible au départ puis amplifiée par un multiplicateur) est également convertie en signal électrique. C'est la conversion photo-électrique des signaux de lumière diffusée vers l'avant, de lumière diffusée latéralement et de lumière fluorescente latérale générée par chacune des particules. Chaque particule détectée comme telle est immédiatement classée. L'intensité de la lumière diffusée vers l'avant (Fsc : *forward scatter*) déduite de l'amplitude du signal électronique

reflète le diamètre de cellule tandis que la largeur du même signal frontal (Fscw : *width*) correspond à la longueur cellulaire. Le signal Fsc reflète principalement les données concernant la taille des cellules ou des particules.

L'intensité de fluorescence latérale (Fl) indique une tendance à une coloration de la cellule ou particule (ou une partie). La largeur (donc la durée : Flw) de cette impulsion du signal de fluorescence latérale reflète la longueur de la zone colorée. De plus, l'impédance qui illustre le volume cellulaire est également mesurée. La lumière fluorescente émise par les cellules colorées de l'urine reflète donc la surface quantitative des cellules, les propriétés nucléaires (quantité d'ARN et d'ADN) et intracytoplasmiques grâce aux propriétés des anticorps colorés et au pigment fluorescent.

La lumière diffusée latéralement (Ssc : *side scatter*) permet de fournir des renseignements sur la structure interne de la cellule ou de la particule : plus l'index Ssc est élevé, plus la structure interne est complexe. Ceci permet, par exemple, de séparer les globules blancs des cellules épithéliales ou les érythrocytes des cristaux.

Chaque type de signal est ainsi généré sur les éléments issus des deux chambres analytiques et les données inhérentes sont précédées d'une lettre B ou S correspondant respectivement à la chambre analytique des micro-organismes (BACT) ou des sédiments (SED).

La combinaison de ces trois signaux générés permet une classification des éléments cellulaires. Les cellules ayant des propriétés physiques et chimiques similaires forment une population similaire sur un graphique appelé diagramme de dispersion (*scattergram*) avec des codes couleurs dédiés et une numération quantitative de chaque type de particule.

Figure 1 – L'automate UF-1000i® (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) distribué par bioMérieux.



Les modèles récents (UF-1000i et UF-500i) de cet automate de cytologie urinaire fonctionnent sur ce principe. L'UF-1000i peut identifier et quantifier cinq paramètres principaux : les érythrocytes (RBC), les leucocytes (WBC), les cellules épithéliales squameuses (EC), les cylindres hyalins (CAST), les bactéries (BACT).

Sept autres paramètres sont détectés : les cylindres pathologiques (Path.CAST), le mucus, les petites cellules rondes (SRC) (cette catégorie inclue les cellules tubulaires rénales et les cellules épithéliales transitionnelles), les cellules *lévuriformes* (YLC), les cristaux (X-TAL) et les spermatozoïdes (SPERM) et la conductivité.

L'automate permet de rendre également des données sur la morphologie générale des globules rouges.

Enfin, il est possible de programmer une alarme UTI (*Urinary Tract infection*) qui met en évidence la probabilité qu'il y ait une véritable infection urinaire sur la base de deux paramètres WBC et BACT.

L'UF-1000i incorpore une série d'alertes qui sont définies par le fabricant mais modulables par l'utilisateur. Les échantillons qui dépassent les seuils significatifs peuvent être étiquetés selon les valeurs de seuil définies par l'utilisateur.

Les recommandations du fournisseur sur les seuils significatifs de trois paramètres principaux : RBC : 25/ μ L, WBC : 20/ μ L et BACT : 100/ μ L ont été déterminées sur la base d'une collecte bibliographique. Les autres paramètres ont des seuils d'alerte recommandés par le fabricant : EC : 15, CAST : 10, X-TAL : 15, YLC : 10, SRC : 10 et Path.CAST : 15. Les valeurs sont ré-ajustables et enregistrées par le fournisseur après discussion avec le biologiste utilisateur selon les spécificités cliniques du laboratoire.

Acquérir un tel automate signifie qu'il ne faut pas négliger le volet des dépenses liées aux réactifs et consommables car il faut se fournir régulièrement en liquide de gainage, en colorants et en diluants des chambres SED et BAC et enfin, en contrôles internes de l'automate à passer quotidiennement.

L'automate UF-1000i fournit des résultats quantitatifs et doit être validé en portée B pour être accrédité au laboratoire selon la norme ISO15189. Dans ce sens, le fournisseur propose une aide pratique à l'accréditation UF-1000i afin de vérifier sur place les performances analytiques de l'appareil.

Il existe également différents contrats de maintenance proposés par bioMérieux, à définir entre le biologiste et le fournisseur.

3.2. SediMAX de A.MENARINI Diagnostics France

Un autre automate de cytologie urinaire appelé SediMAX® (*figure 2*) existe sur le marché et a été comparé à la microscopie manuelle [3]. Cet appareil est fabriqué par Elektronika77 (Budapest, Hongrie) et distribué par A. Menarini Diagnostics France.

L'automate affiche une cadence d'analyse qui peut atteindre 120 échantillons par heure dans la version SediMAX 2®. Sa capacité de chargement est de 100 tubes (10 échantillons par portoirs). Le lecteur code-barres est intégré. L'automate travaille avec un système de cuvettes à usage uniques disposées sur des colonnes de 50 cuvettes. La capacité de chargement est de 12 colonnes, soit 600 cuvettes à bord de l'appareil.

Figure 2 – L'automate SediMAX® (distribué par A. MENARINI Diagnostics France).



Le principe analytique de cet automate est basé sur la capture d'image microscopique. L'urine est aspirée et un volume de 200 µL est inséré dans la cuvette à usage unique. Cette cuvette est ensuite centrifugée (centrifugeuse intégrée, 10 secondes à 2000 rpm) ce qui permet d'obtenir une couche cellulaire unistratifiée du sédiment urinaire. La cuvette est ensuite analysée par un microscope classique couplé à une caméra numérique qui prend des clichés et permet de classer automatiquement les éléments en 15 types de particules en se basant sur leur taille, leur forme et leur texture à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. L'imagerie digitale et le logiciel de reconnaissance automatique des particules sont utilisés pour classer les particules et les cellules urinaires et fournissent ainsi des résultats quantitatifs et semi-quantitatifs.

La caméra prend 5, 10, 15 ou 20 images numériques (le nombre d'images est paramétrable) en résolution HPF (*High Power Field*) ou LPF (*Low Power Field*) sur différentes zones de la cuvette. Le logiciel de reconnaissance de formes détecte et classe les particules et les cellules. L'opérateur peut visualiser les images présentant des champs complets, identiques à ceux observés en microscopie manuelle et utiliser la fonction zoom. Le résultat peut être revu et corrigé par l'utilisateur qui peut également identifier et quantifier 32 autres éléments en manuel. Le résultat est exprimé à la fois en nombre de particules par µl et en catégorie de classification. Les données sont tracées avec une capacité de stockage de 10 000 résultats-échantillons avec images (SediMAX 2®). Il existe plusieurs versions améliorées du SediMAX® qui sont : le SediMAX 2®, le SediMAX *conTRUST*® (disponible courant 2016) et le SediMAX *LITE*® (disponible fin 2016).

Le SediMAX 2® bénéficie d'une cadence de travail plus élevée (120 échantillons traités par heure), d'une caméra plus performante, d'une qualité de focus améliorée, d'un mécanisme plus silencieux et d'un nouveau module d'évaluation qui permet de différencier les bactéries coccoïdes des bacilles. Cette version permet également à l'utilisateur de contrôler totalement la microscopie, en déplaçant la cuvette et/ou en modifiant le focus (option examen manuel).

Le SediMAX *conTRUST*® permet une double capture d'image. L'opérateur dispose ainsi à la fois d'images en lumière directe et d'images en contraste de phase. Cela lui permet d'affiner la reconnaissance de certaines particules urinaires telles que les cristaux. La cristallurie est donc mieux étudiée sur cette version.

Le SediMAX *LITE*® est une version semi-automatique de l'automate, idéale pour des laboratoires de petit volume ou dédiés aux urgences techniques, voire en *back up*. La gamme SediMAX® permet de détecter et quantifier en automatique les cellules ou particules suivantes : les érythrocytes, les leucocytes, les cylindres hyalins et pathologiques, les cellules épithéliales, les cellules rondes, les bactéries, les levures, les cristaux (oxalate de calcium monohydrate et dihydrate, acides urique, tri-phosphate), le mucus et les spermatozoïdes. Disposant d'images présentant des champs complets, l'utilisateur peut également détecter d'autres éléments urinaires moins typiques.

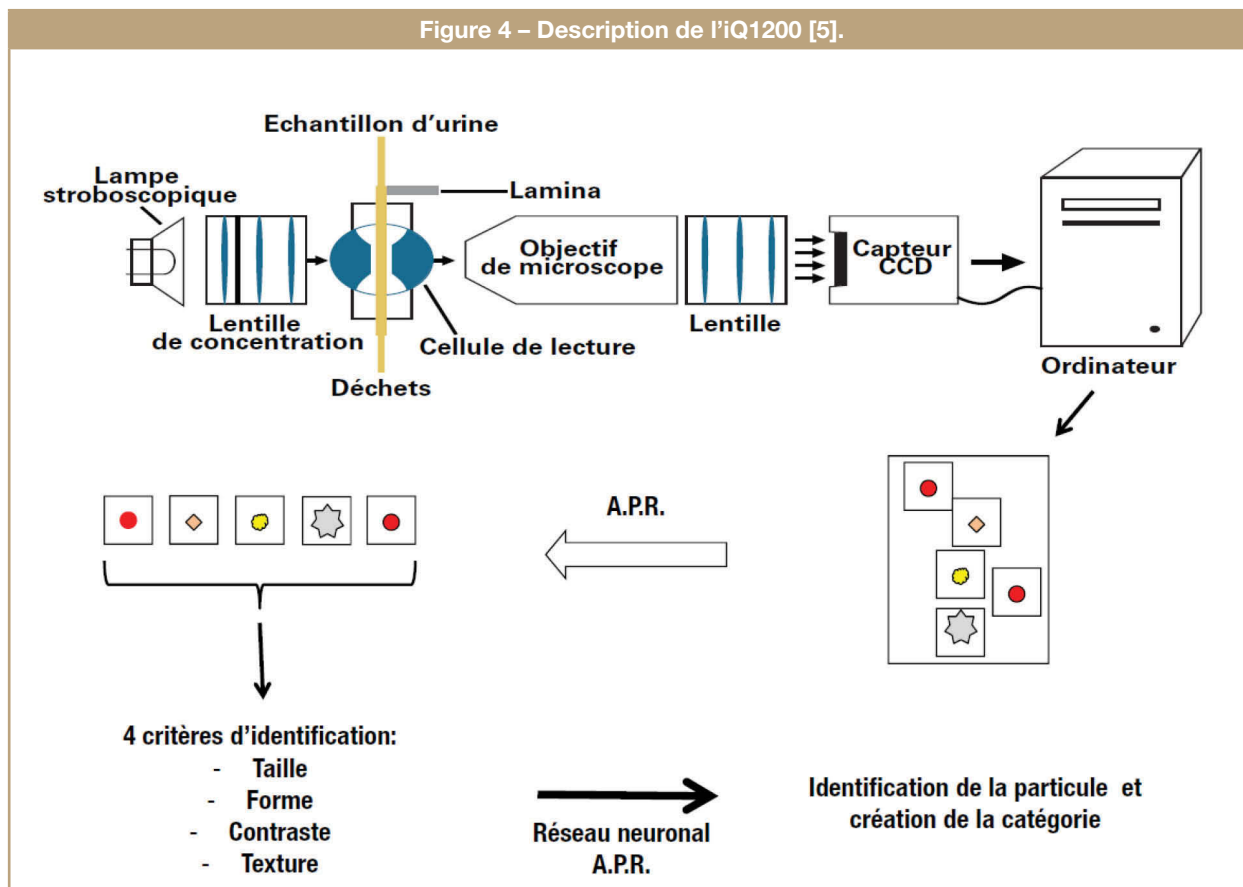
Le seul consommable de cet appareil est la cuvette à usage unique.

L'automate UriSed® (77 ELEKTRONIKA Kft, Budapest, Hongrie) distribué par I2A [1] fonctionne sur le même principe [4] (figure 3).

Figure 3 – L'automate UriSed® (77 ELEKTRONIKA Kft, Budapest, Hongrie).



Figure 4 – Description de l'iQ1200 [5].



3.3. La série d'automates iQ 200 d'IRIS DIAGNOSTICS

La gamme d'automates iQ200 d'IRIS DIAGNOSTICS (figure 4), distribué en France par Beckman Coulter, utilise le principe d'imagerie numérique associé un logiciel de reconnaissance automatique des particules (appelé APR) pour classer et quantifier les particules urinaires contenues dans une urine non centrifugée. Le principe analytique est détaillé dans l'article de Dewulf et al [5] qui reprend les points essentiels suivants.

Les éléments urinaires sont photographiés par une caméra numérique haute définition CCP (*charged couple device*) dans un flux cellulaire planaire qui oriente et exerce sur les particules un mouvement hydrodynamique dans le plan focal de l'objectif du microscope : c'est la technologie de morphologie à flux numérique (*Digital Flow Morphology*). La série d'automates iQ200 utilise l'imagerie digitale pour prendre et analyser 500 photographies de chaque échantillon traité et le logiciel APR (*Auto Particule Recognition*) va classer les images en cellules ou particules urinaires selon la texture, le contraste, la forme et la taille des éléments. L'automate iQ200 alors présente la classification à l'utilisateur pour une confirmation rapide à l'écran. Ce dernier peut définir les modalités d'auto-validation automatique et ne garder que les dossiers complexes si besoin. La technologie de validation automatique de résultats (EFR) permet un flux de travail amélioré car elle permet de ne présenter à l'utilisateur (technicien, biologiste) que des

dossiers complexes. Le cytomètre classe les images en douze catégories et peut quantifier 27 sous-catégories supplémentaires comprenant par exemple : les érythrocytes (RBC), les leucocytes (WBC), amas de leucocytes (*WBC clumps*), cylindres hyalins (et autres cylindres non classés), cellules épithéliales pavimenteuses et non pavimenteuses, bactéries, levures, cristaux, mucus et les spermatozoïdes. Les images numériques des particules sont conservées, environ 500 clichés par échantillon, et peuvent être visualisées et reclassées par l'opérateur, potentiellement sans besoin de recourir à la microscopie manuelle. Le prélèvement n'est pas coloré et l'aspect des différents composants peut mettre en difficulté un observateur pourtant entraîné mais qui est habitué à la lecture traditionnelle des lames colorées. Cette difficulté peut être levée à l'issue de quelques séances d'entraînement. La gamme d'automates iQ200 existe en plusieurs versions adaptées à toutes les charges de travail : il existe donc trois analyseurs iQ200 SELECT, ELITE et SPRINT qui traitent respectivement 40, 70 et 110 échantillons par heure. L'automate iQ200 permet aussi l'analyse en microscopie de flux d'autres liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, liquide articulaire...) grâce à un module spécifique et cette action peut être faite dans une série contenant aussi des prélèvements urinaires.

Enfin, l'iQ200 offre également des solutions pour être conforme aux exigences de la norme 15189, une traçabilité des données résultats patients (résultats bruts, modification des résultats...), des contrôles qualités, des réactifs et des consommables (numéro de lots, dates d'expiration).

4. Discussion générale : comment aborder l'acquisition d'un automate de cytologie urinaire ?

L'acquisition d'un automate de cytologie urinaire se fait généralement à l'issue d'une étude médico-économique validée à la fois par l'équipe médico-technique (biologistes médicaux) et les services biomédical et financier de l'établissement concerné.

L'évaluation générale peut être réalisée sur site et débiter par une période d'essai des différents automates disponibles sur les centrales d'achats groupés du marché privé ou public (Uni-HA et UGAP par exemple). L'étude technique se fait en présence du personnel (biologistes et techniciens de laboratoire) et va aborder les caractéristiques générales (niveau sonore, climatisation, nécessité d'un arrêt quotidien

de l'automate, réseaux électrique et informatique...). Le logiciel d'un automate doit idéalement être convivial, pratique et comporter des paramètres pertinents (compte utilisateur, seuils pathologiques, seuils de validation technique, critères de rejet...). Il faut impérativement passer en revue toutes les caractéristiques techniques suivantes : facilité de chargement des tubes, compatibilité avec les tubes boratés utilisés, chargement en continu avec une fonction urgence, durée de l'analyse, les volumes aspirés et analytiques, existence et prise en charge des interférences en cas d'urines troubles (purulentes, hémorragiques...).

Tous les automates ne se valent pas : un automate donné sera capable d'identifier et de quantifier certains paramètres (hématies, leucocytes par exemple) mais ne pourra qu'en détecter d'autres (cristaux, par exemple). Le choix de l'automate doit aussi tenir compte des attentes des cliniciens prescripteurs au sein d'un établissement donné. Le **tableau II** reprend certains des caractéristiques techniques des trois

Tableau II – Spécifications techniques des automates de cytologie urinaire.

Nom de l'automate	UF-1000i	SediMAX	iQ200
Date de commercialisation	2006	2009	2003
Éléments identifiés	GR GB Cellules épithéliales Bactéries Autres éléments détectés : Cylindres Cylindres pathologiques Cristaux Petites cellules rondes Spermatozoïdes Levures Mucus Débris	GR GB Cellules épithéliales Petites cellules rondes Cylindres hyalins Cylindres pathologiques Bactériurie avec une différenciation entre cocci et bacille. Cristaux : - oxalate de Ca (mono et dihydrate) - acides uriques - Triphosphates Levures. Parasites (schistosomes) en mode manuel. Spermatozoïdes Mucus	GR GB Amas de GB Cylindres Bactéries Cristaux Cellules épithéliales pavimenteuses Cellules épithéliales non pavimenteuses Levures Spermatozoïdes Mucus
Sous-qualification quantifiable	- Oui pour les hématies - Non pour les cristaux et cylindres - Fournit Information sur le pourtour des cristaux (oxalates)	Oui pour hématies, cristaux, cylindres et autres cellules.	- Oui pour hématies, cristaux et cylindres - Les cristaux de borate sont comptabilisés en cristaux (si utilisation de tube boratés)
Principe analytique	Cytométrie en flux avec diode laser et focalisation hydrodynamique	Microscopie automatique du sédiment urinaire avec un logiciel de reconnaissance des particules	Microscopie urinaire à imagerie numérique couplée à un logiciel de reconnaissance des particules (APR)
Cadence (échantillons par heure)	Jusqu'à 100 (80 avec protocole anti-contamination)	80-120 (5 à 20 images par échantillon)	iQ SPRINT : 101 iQ ELITE : 70 iQ SELECT : 40
Contrôles	Deux niveaux de contrôles : CQ haut et bas Comportent de nombreux paramètres dont des hématies et des leucocytes. Passage quotidien	Un Contrôle négatif. Un Contrôle positif. Comportent des hématies et des leucocytes. Passage quotidien.	Un contrôle positif Un contrôle négatif Comportent uniquement des hématies. Passage quotidien
Volume minimal d'échantillon	4 mL (1 mL en mode manuel)	2 mL	2 mL
Volume analytique	0,8 mL (manuel) 1,2 mL (automatique)	0,2 mL	0,8 mL

Tableau IV – Performances analytiques des différents automates de cytologie urinaire [1].

Nom de l'automate	Éléments urinaires	Bornes de vérification de linéarité (10 ³ par mL)	Moyenne de concentration cellulaire (10 ³ par mL)	Répétabilité CV %	Reproductibilité CV %	Références
UF-1000i®	GB	-	18	10,5	-	[7]
			375	2,1	-	
			45	-	8	
			790	-	5,2	
	BACT	-	52	15,2	-	
			850	8,9	-	
			195	-	11,7	
			715	-	7,6	
	GR	0,1-10 ³	10 ⁻¹	78,6	< 10	[6]
			10 ⁵	0,4	<10	
			>10 ²	<10	<10	
	GB	0,1- 10 ²	10 ⁻¹	96,4	< 10	
			10 ⁴	0,7	< 10	
			> 10	<10	<10	
	BACT	0.1-10 ³	5.10 ⁻¹	74,2	< 10	
			10 ⁵	3,1	< 10	
			> 10 ²	< 10	<10	
iQ200®	GR	-	12,25	32,6	-	[8]
			1 246	6,2	-	
			114,9	10,4	-	
	GB	-	464,6	4	-	
			45,9	30	-	
			6,35	48,4	-	
	CENS	-	6,65	6,65	-	
	Levures	-	32,7	25,1	-	
	GR	22 - 846	14,4	26,48	-	[5]
			91,1	8,33	-	
			230,7	9,78	-	
	GB	4.5 - 1029	11,1	17,9	-	
			121,8	6,41	-	
			824,9	10,16	-	
	Particules	1 - 984	514	4,6	-	
			920	3,3	-	
			969,4	-	5,57	
	GR	-	786-1029	3,0-5,6	-	[9]
			253-356	3,4-8,4	-	
			100-145	4,2-13,5	-	
			17-20	14,0-29,6	-	
			1017	-	3,3	
			802	-	4,8	
			443	-	7,2	
			155	-	7,4	
			28	-	19,2	
	GB	-	794-1 006	2,4-3,4	-	
			258-380	4,5-6,7	-	
			79-115	3,1-15,3	-	
			16-30	12,6-22,3	-	
	EC	-	59-93	8,9-14,8	-	
			39-59	10,1-15,5	-	
			13-22	18,1-31,3	-	
SediMAX®	GR	-	18	17,8	-	[3]
			30	-	14,7	
			283	-	7,2	
			447	6,7	-	
	GB	-	4	16,6	-	
			25	-	5,4	
			166	-	3,0	
			258	4,4	-	

CES: Cellules épithéliales squameuses.
CENS: Cellules épithéliales non-squameuses.

Tableau III – Valeurs fournisseurs (par μL) des paramètres d'alertes automatiques

	UF-1000i	SediMAX	iQ200
Leucocytes	20	10	10
Erythrocytes	25	10	10
Cellules épithéliales	50	2	1
Cristaux	5	6	15
Cylindres	10	10	1
Levures	1	3	2
Bactéries	100	75	1

automates traités dans ce papier. Les seuils de détection doivent être connus ainsi que les performances analytiques (répétabilité, reproductibilité, sensibilité, spécificité et contamination inter-échantillon). Le **tableau IV**, inspiré de l'article de Block et al [1], regroupe certaines valeurs de performances analytiques retrouvées dans la littérature [3, 5-9]. L'évaluation technique ne doit pas négliger les modalités de calibration de l'automate, de passage de contrôle qualité et le remplacement des réactifs. Le traitement des déchets est aussi important à prendre en compte (nature des déchets, volume, mode de production et traitement).

Dans une optique d'accréditation du laboratoire d'analyse médicale, tous les fournisseurs proposent un accompagnement à la mise en place de la norme ISO 15189 en répondant aux problématiques de traçabilité (session utilisateur, échantillons, réactifs contrôle qualité et calibrant), d'archivage (support, fréquence, durée), de mise à jour périodique du logiciel de l'automate et de gestion des dates de péremptions et de numéros de lots (réactifs, calibrants et contrôles qualité). La maintenance de l'automate est capitale et impérative : elle possède généralement un coût financier et technique et doit être connue et clairement définie avec les fournisseurs. Il faut en connaître la nature et la durée pour anticiper la mise en place d'une procédure dégradée. La maintenance peut être journalière, hebdomadaire, mensuelle ou semestrielle et effectuée par l'utilisateur et/ou par le fabricant en fonction de la complexité des tâches. La maintenance sera ensuite tracée dans un registre dédié. Enfin, la gestion des pannes d'automates doit être anticipée. Il faut prévoir la démarche à suivre (hotline joignable ou non, 7 jours sur 7, passage en

procédure dégradée...) et définir éventuellement un prêt de matériel gratuit en cas de panne prolongée. Avec l'ensemble de ces données techniques, le biologiste peut choisir un automate de cytologie urinaire en ayant à l'esprit que la cytologie urinaire reste un examen de laboratoire très prescrit que ce soit en milieu hospitalier ou communautaire et que la maîtrise de l'aspect technique de cet examen est capitale pour rendre un résultat correct et reproductible au prescripteur clinicien.

5. Conclusion

Sur le marché français, différents automates de cytologie urinaire existent et présentent principalement deux principes analytiques : d'une part le principe de fluoro-cytométrie de flux pour analyser le culot urinaire (UF-1000i) et de l'autre, et de l'autre, le principe d'analyse photographique des cellules et particules urinaires passant devant un objectif microscopique soit après centrifugation interne (SediMAX) ou non (iQ200).

Les automates de cytologie urinaire permettent d'améliorer la productivité du laboratoire de bactériologie en optimisant les compétences des techniciens de laboratoire à des tâches plus complexes à valeur ajoutée à condition de définir clairement les critères d'acceptabilité des résultats bruts. L'automate permet d'assurer la traçabilité des données relatives aux analyses d'ECBU et d'harmoniser les pratiques et les résultats de cytologie urinaire. Une économie en temps technicien est donc possible mais en établissant des critères de révision microscopique des examens.

L'acquisition d'un automate de cytologie urinaire suppose une évaluation de ses performances (répétabilité, reproductibilité, contamination inter-échantillon et linéarité) au laboratoire dans le cadre de la validation de méthode d'analyse en portée B. Les fournisseurs d'automate sont également sensibilisés à la norme 15189 et proposent généralement un accompagnement technique en vue de l'accréditation de cette analyse automatisée au laboratoire. L'acquisition d'un automate ne doit pas se faire sans une étude de rentabilité en fonction du volume d'activité et du coût lié aux réactifs et consommables.

Conflits d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Block DR, Lieske JC. Automated urinalysis in the clinical lab. MLO Med Lab Obs. 2012 Oct;44(10):8-10.
- [2] Martin C, Ploy M-C. Automatisation en bactériologie. J Anti-Infect. 2014;16(3):122-30.
- [3] Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, Croci MD, Bayer G, Kráncz T. Urine sediment analysis: Analytical and diagnostic performance of sediMAX - a new automated microscopy image-based urine sediment analyser. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. févr 2010;411(3-4):147-54.
- [4] Martinez MHM, Bottini PV, Levy CE, Garlipp CR. UriSed as a screening tool for presumptive diagnosis of urinary tract infection. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 21 oct 2013;425:77-9.
- [5] Dewulf G, Harrois D, Mazars E, Cattoen C, Canis F. Évaluation des performances de l'automate de cytologie urinaire Iris iQ® 200 ELITE et comparaison avec la méthode manuelle microscopique. Pathol Biol. 2011;59(5):264-8.
- [6] Fabbro C, Darolles J, Rault J-P. Évaluation des performances de l'automate d'analyse urinaire UF-1000i®. In: Annales de Biologie Clinique 2011. p. 431-9.
- [7] Giesen CD, Greeno AM, Thompson KA, Patel R, Jenkins SM, Lieske JC. Performance of flow cytometry to screen urine for bacteria and white blood cells prior to urine culture. Clin Biochem. juin 2013;46(9):810-3.
- [8] Linko S, Kouri TT, Toivonen E, Ranta PH, Chapoulaud E, Lalla M. Analytical performance of the Iris iQ200 automated urine microscopy analyzer. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. oct 2006;372(1-2):54-64.
- [9] Wah DT, Wises PK, Butch AW. Analytic performance of the iQ200 automated urine microscopy analyzer and comparison with manual counts using Fuchs-Rosenthal cell chambers. Am J Clin Pathol. févr 2005;123(2):290-6.
- [10] Guide d'utilisation iQ200 series ®: 300-4321-French International Rev E 07/2012.
- [11] Mode d'emploi Sysmex UF-1000i: version 2006.
- [12] Brochure SediMAX: consultable sur www.menariniagnostics.fr

Méthodes moléculaires et automatisation en microbiologie

Jean-Louis Herrmann^a

RÉSUMÉ

La biologie moléculaire fait maintenant partie inhérente de l'arsenal diagnostique. Porté par les développements en virologie médicale, l'ensemble de la microbiologie médicale semble ne plus pouvoir déroger à la biologie moléculaire devant les potentiels services rendus au patient. De même, une automatisation permettant de dégager du temps afin d'améliorer la prise en charge des prélèvements positifs doit apporter également cette efficacité. Mais il reste là encore un peu de chemin à parcourir.

Automatisation - biologie moléculaire.

1. Introduction

Les méthodes moléculaires sont basées sur la détection et la caractérisation partielle ou complète d'ADN ou d'ARN microbiens dans l'échantillon clinique. En microbiologie, ils peuvent être utilisés à des fins de recherche ou diagnostiques, épidémiologiques. Toutefois, seules les méthodes utilisées en microbiologie diagnostique seront brièvement présentées. Les méthodes moléculaires ont radicalement changé la microbiologie clinique. Elles ont permis la découverte de quelques pathogènes cliniquement importants et précédemment non reconnus ou non cultivables et réduit la dépendance du laboratoire vis-à-vis des méthodes axées sur la culture. En fait, dans de nombreux cas, les méthodes moléculaires ont remplacé la culture comme diagnostic standard ou « gold standard » (*Chlamydia trachomatis*, l'encéphalite herpétique, méningite à entérovirus). Au cours des deux dernières décennies, les méthodes moléculaires sont devenues plus standardisées, précises, automatisées, rapides, fiables et économiques, et ont prouvé leur valeur clinique pour le diagnostic et la gestion de plusieurs maladies infectieuses. Lorsqu'elles sont appliquées à bon escient et de façon sélective, les tests moléculaires représentent aujourd'hui un élément indispensable de la pratique de laboratoire de routine du microbiologiste.

D'autre part, la microbiologie médicale bénéficie dorénavant de l'automatisation retrouvée en biochimie et en hématologie. Par contre, cette automatisation en microbiologie

SUMMARY

Molecular methods and automation in microbiology

Molecular Biology is now inherent part of our diagnostic arsenal. As demonstrated by the developments in medical virology, the whole of the medical microbiology seems no longer contravene the use of molecular biology in front of the potential services rendered to the patient. Similarly, automation for releasing time to improve technical support for the positive specimens must also bring this efficiency. But there is still some way to go.

Automation - molecular biology.

médicale conduit à repenser complètement l'organisation du laboratoire, tourné presque exclusivement vers la culture microbienne. En effet, la culture en bactériologie et en mycologie reste la méthode analytique de choix. Mais, il n'y a pas en fait de véritable plus-value humaine : étape pré-analytique, ensemencement, incubation. Le choix de l'automate sera donc lié à différentes plus-values, aussi bien médicale que technique. Cette revue s'inspire du travail publié dans le référentiel de Microbiologie V5, et l'auteur propose dans ce cadre des références complémentaires pour en savoir plus sur ce sujet. L'auteur remercie les auteurs des chapitres concernés pour l'emprunt qu'il en a fait pour obtenir ce condensé.

2. Principales applications en biologie moléculaire

Les principales applications des tests moléculaires en microbiologie clinique ainsi que les meilleurs exemples (entre parenthèses) sont les suivantes. Ce qui est essentiel est d'observer l'essor technologique de ces dernières années, ayant vu notamment l'avènement de la PCR en temps réel et du tout en un, évitant les contaminations, et permettant des diagnostics rapides dans des contextes cliniques précis : portage ou infection *Streptococcus* B, tuberculose bacillifère, méningite herpétique, bactérienne... L'ajout de détection moléculaire rapide de résistance bactérienne ou virale impacte fortement le service médical rendu.

1- Diagnostic des maladies infectieuses causées par des microorganismes qui se développent lentement en culture (*Mycobacteria*, *Chlamydia*, *Bordetella pertussis*), pour lesquelles la culture ou d'autres méthodes diagnostiques ne sont pas disponibles ou non existantes (*Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp.,

^a AP-HP, Hôpital Raymond Poincaré,
Service de Microbiologie
104, Bd Raymond Poincaré - 92380 Garches

* Correspondance
jean-louis.herrmann@rpc.aphp.fr

article reçu le 31 décembre 2015, accepté le 31 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Tropheryma whippelii, human papillomavirus, nouveaux parvovirus, ou polyomavirus), pour celles dont la sensibilité aux antibiotiques n'est pas systématiquement requise (*chlamydia*, *B. pertussis*), pour les bactéries productrices de toxine (*Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*), où une détection rapide et fiable des patients infectés ou colonisés et des travailleurs de la santé est utilisée pour réduire au minimum la propagation des bactéries résistantes aux antimicrobiens dans les établissements de santé (*S. aureus* méticilline-résistant), lorsque la possibilité élevée de résultat faussement négatif de culture existe en raison des traitements antibiotiques actuels (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, endocardite), enfin lorsque les méthodes de culture sont trop lentes et peu sensibles pour les décisions pertinentes sur le plan clinique et/ou ne sont pas rentables (encéphalite HSV, méningite à enterovirus et parechovirus, infection à CMV et EBV chez les sujets immuno-compromis).

2- Diagnostic de certaines infections virales dans une phase précoce de l'infection aiguë par exemple, avant la séroconversion, ou chez les sujets présentant des résultats indéterminés des tests de confirmation (HIV, HBV, HCV), chez les nourrissons nés de mères infectées (HIV, HCV, CMV), pour le dépistage des donneurs de sang, organes et de tissus en plus des marqueurs sérologiques classiques (HIV, HCV, HBV), pour résoudre les incertitudes diagnostiques suite à un test sérologique (HIV, HCV, HBV).

3- Identification moléculaire des bactéries de croissance lente (Mycobactéries) et les champignons, quand les bactéries « classiques » présentent un modèle phénotypique inhabituel (*S. pneumoniae* optochine-résistant, *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose), lorsque l'identification fiable à l'aide des méthodes phénotypiques conventionnelles n'est pas possible ou non performante (bacilles Gram négatif non-fermentaires), pour la détection simultanée et l'identification d'un ou de plusieurs micro-organismes en un seul test (virus respiratoires, virus responsable d'infection du système nerveux central ou de diarrhées), identification et caractérisation des agents pathogènes émergents pour lesquelles des méthodes autres que moléculaires ne sont pas disponibles (nouveaux parvovirus, ou polyomavirus).

4- Détection moléculaire de la résistance antimicrobienne. Bien qu'il était envisagé à termes, que les méthodes moléculaires se substituent aux méthodes phénotypiques, cela n'a pas été suivi d'effet, en fait, et la détection moléculaire de la résistance antimicrobienne n'est très utile que dans certaines situations : par exemple, chez les bactéries dont le fond génétique de la résistance est bien définie, relativement simple à détecter et les tests moléculaires peuvent être effectués directement sur les échantillons cliniques contournant ainsi l'isolement et réduisant sensiblement le délai de rendu (la résistance à la méticilline chez *S. aureus*, la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, la résistance à la rifampicine chez *M. tuberculosis*), et chez les virus où la détermination phénotypique de la résistance est trop lente ou trop chère (HIV, CMV) ou non existante (HBV, HCV).

5- Pour le pronostic de la progression de la maladie (charge virale : HIV-1, HBV, génotypage des papillomavirus humains), évolution vers la mort (charge virale HIV-1), pour prévoir les risques et distinguer une maladie active contre une infection asymptomatique chez les greffés (charge virale CMV, EBV, BK, polyomavirus).

6- Prévision et suivi de la réponse du patient au traitement antiviral (charge virale HIV and détermination de la résistance chez les patients infectés ; génotype viral, charge virale et polymorphisme IL-28 chez les patients HCV-infectés, charge virale HBV chez les patients HBV-infectés ; détection de la résistance chez les transplantés CMV-infectés), détermination de la durée de la thérapie antivirale (génotype viral, cinétique de la charge virale et polymorphisme IL-28 chez les patients infectés par le VHC), guider les cliniciens (détermination du tropisme viral du VIH) et à la thérapie antivirale (VIH, VHB et CMV résistance dépistage des drogues), de changer la décision d'initier le traitement préemptif chez les greffés (charge virale CMV).

Les tests moléculaires peuvent s'effectuer sur un large éventail d'échantillons allant des micro-organismes cultivés à des échantillons cliniques fraîchement prélevés (sang, urine, selles, liquide cérébro-spinal etc.) ou des échantillons cliniques dits archives ou conservés depuis longtemps. Toutefois, chaque protocole moléculaire doit être rigoureusement validé pour un type d'échantillon et utilisé uniquement pour les types d'échantillons validés. Les tests moléculaires commerciaux ne devraient pas être utilisés sur d'autres types d'échantillons que ceux évalués et spécifiés par le fabricant. La majorité des échantillons doit être envoyée au laboratoire dans les 2 heures suivant le prélèvement. Celui-ci peut être conservé à + 4 °C jusqu'à 24 heures. Pour une conservation plus longue, ou en cas de tests retardé, les échantillons devront être congelés à - 30 °C, idéalement à une température inférieure à 70 °C. De nombreuses techniques sont actuellement employées, et sont décrites dans de nombreuses revues de la littérature. Le choix de l'amplification en temps réel, au sein d'automates tout en un a grandement amélioré la prise en charge de ces prélèvements au laboratoire, le développement de la biologie moléculaire au sein des laboratoires notamment dans les organisations 24 H/24 et 7j/7 ; et enfin a permis d'éliminer le problème de contamination inter-échantillons. Des automates sont maintenant à disposition permettant de traiter en série plusieurs échantillons et plusieurs analyses simultanément.

3. L'automatisation au laboratoire

Autant le concept est ou était évident pour la biologie moléculaire, comme indiqué ci-dessus ; autant la mise en place d'automates en microbiologie, notamment pour les tâches quotidiennes représente à la fois un challenge technique et un challenge humain. De plus doit-on répéter ou reproduire le geste manuel humain ou concevoir des approches techniques plus novatrices, accroît la difficulté technologique. Enfin, notre laboratoire de microbiologie clinique est amené à gérer de très nombreux prélèvements négatifs, d'où le choix de mettre en place des méthodes

automatisées de gestion de ces prélèvements. Mais tous les savoir-faire du microbiologiste ne peuvent être automatisés. Ainsi, les prélèvements qui nécessitent un traitement particulier (os, prothèses, valves cardiaques, par exemple) ne peuvent pas être inclus dans une chaîne automatisée/robotisée. Pour ce dernier point, nous avons potentiellement l'outil en la présence des automates d'hémocultures. Pourquoi au cours du temps n'a-t-on pas envisagé le monitoring automatisé d'autres prélèvements en culture liquide par ces automates, notamment précieux comme ceux cités plus haut. Nous l'avons fait au laboratoire pour les prélèvements ostéo-articulaires, et liquide ponction, évitant ainsi au personnel technique d'avoir à penser aux cultures à lire à 5, 7 ou 14 jours. Cela représenterait déjà une avancée significative dans la gestion de nos bouillons d'enrichissement souvent effectués pour ces prélèvements précieux.

L'étape pré-analytique reste importante à considérer : rythme d'arrivée des échantillons, sous quel format, pré-traitement ou pas de l'échantillon comme par exemple les expectorations. La phase analytique reste essentielle, car nous sommes toujours en présence d'un ensemencement par isolement qui n'a pas évolué depuis sa mise à place par Julius Pétri, inventeur de la boîte éponyme. Lorsque l'on fidélise les techniciens à ce poste de réception et isolement de tout prélèvement arrivant au laboratoire, on constate une vraie amélioration des isolements lus à la paillasse. Une robotisation de cette étape analytique est à haute valeur ajoutée, parce qu'elle améliore la qualité des isolements, réduit sa variabilité et fluidifie le flux du

travail. Des critères précis tel que décrits dans le Rémic V5 permettront de faire le choix de l'automate d'ensemencement. L'incubation qui suit l'étape d'ensemencement est cruciale, et doit s'effectuer au fil de l'eau plutôt que par lot. Elle doit permettre de tenir des différentes atmosphères d'incubation utilisées au laboratoire. L'incubateur doit avoir la capacité de détecter une croissance microbienne à la surface des milieux de culture (incubateur dit « intelligent »). Pour cela, l'incubateur doit détecter cette croissance à intervalle régulier après quelques heures d'incubation, la poursuivre au-delà de 24 h. La durée de l'incubation doit atteindre 5 jours pour les bactéries à croissance lente. En cas de positivité, l'idéal comme automate serait celui pour lequel les colonies sont très bien visualisées, prélevées afin d'obtenir une suspension homogène, notamment les critères CA-SFM/EUCAST, et qui servirait à la fois pour l'identification (Spectromètre de masse, Biologie Moléculaire) et l'antibiogramme. À ces étapes correspondent d'ailleurs des automates, pour l'antibiogramme en milieu solide ou liquide, et pour l'identification avec les automates de biologie moléculaire et les spectromètres de masse. Nous bénéficions donc déjà d'une automatisation de nos pratiques quotidiennes en microbiologie. Il ne nous manque que la chaîne complète afin de nous permettre de nous focaliser que sur les échantillons précieux et/ou positifs.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Bibliographie

- [1] Nolte FS, Caliendo AM. Molecular microbiology. In: Versalovic J, Ed. Manual of clinical microbiology (10th edition). Washington DC: ASM Press; 2011. p. 27-59.
- [2] Persing DH, Tenover FC, Tang Y-W, Nolte FS, Hayden RL, van Belkum A, Eds. Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 3-909.
- [3] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 165-256.
- [4] Rabenau HF, Raggam RB, Salzer HJF. Choice of adequate sample material. In: Kessler HH, Ed. Molecular diagnostics of infectious diseases. Berlin: Walter de Gruyter; 2010. p. 1-23.
- [5] Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 550-576.
- [6] Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol 2007; 40: 93-98.
- [7] Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. Curr Issues Mol Biol 2007; 9: 21-40.
- [8] Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. J Microbiol Methods 2009; 76: 217-225.
- [9] Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of the 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology. Clin Microb Infect 2008; 14: 908-934.
- [10] Relman DA. Microbial genomics and infectious diseases. N Engl J Med 2011; 365: 347-57.
- [11] Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8: 1139-1162.
- [12] Whitley DM, Sloots TP. Molecular amplification methods in diagnostic virology. In: Jerome KR, Ed. Lennette's laboratory diagnosis of viral infection (4th edition). New York: Informa Healthcare; 2010. p. 19-39.
- [13] Courcol et al., Automatisation des cultures microbiennes: quel cahier des charges? Rémic V5
- [14] Poljak and Herrmann, Molecular methods in diagnostic microbiology. European Manual of Clinical Microbiology
- [15] Rabenau HF, Raggam RB, Salzer HJF. Choice of adequate sample material. In: Kessler HH, Ed. Molecular diagnostics of infectious diseases. Berlin: Walter de Gruyter; 2010. p. 1-23.

Automatisation de l'identification bactérienne

Philippe Riegel^{a,*}, Dominique de Briel^b, Olivier Dauwalder^c

RÉSUMÉ

L'identification bactérienne est essentielle dans le processus d'un examen bactériologique en donnant au clinicien des informations importantes sur la gravité, l'origine ou le traitement d'une infection. Pour cela, elle doit être à la fois fiable et rapide, certaines circonstances l'exigeant. L'automatisation de l'identification bactérienne a concerné d'abord l'inclusion de tests phénotypiques, biochimiques pour la plupart, dans des supports miniaturisés, avec lecture et interprétation intégrées. On peut citer le Vitek[®] (bioMérieux), le Phoenix[®] (BD) et le MicroScan[®] (Siemens puis Beckman). Bien que ces automates aient des performances tout à fait acceptables, ils sont limités par des souches parfois peu réactives et par une base de données reflétant difficilement l'hétérogénéité de certaines espèces. C'est notamment le cas pour des espèces nonfermentantes ou avec peu de souches connues. Depuis quelques années, nous assistons à l'avènement de l'utilisation de la spectrométrie de masse Maldi-Tof pour l'identification bactérienne basée sur la différence de masse de protéines cellulaires dont une majorité de protéines ribosomales. Les performances sont supérieures à celle des méthodes phénotypiques et globalement semblables entre les deux systèmes proposés Microflex-Biotyper (Bruker) et Shimadzu-VitekMS (bioMérieux). Quelques espèces phylogénétiquement proches sont difficilement identifiables par cette technologie mais ces problèmes sont habituellement bien répertoriés. La spectrométrie de masse Maldi-tof peut identifier la plupart des espèces avec seulement une souche dans la base de données et le délai du résultat est réduit à quelques minutes. Cette technologie peut aussi être adaptée à l'identification directe à partir de prélèvements comme les hémocultures positives.

Automate – identification – phénotypie – spectrométrie de masse.

1. Introduction

L'identification bactérienne constitue une information essentielle dans le diagnostic microbiologique d'une infection. Elle doit être fournie au clinicien afin qu'il puisse trouver les réponses aux principales questions posées : infection ou non ? C'est le cas par exemple de l'interprétation d'une hémoculture positive à *Staphylococcus aureus* ou à staphylocoques coagulase négative ; infection transmissible ou non ? Un méningocoque ou une *Listeria* doit

^a Laboratoire de Bactériologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,

^b Laboratoire de Microbiologie

Hôpitaux Civils de Colmar

^c Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et Pathologie Est

Institut de Microbiologie, Hospices Civils de Lyon

* Correspondance

philippe.riegel@chru-strasbourg.fr

article reçu le 31 décembre 2015, accepté le 31 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Automated bacterial identification

The bacterial identification is essential in the process of a bacteriological examination by giving to the clinician of the important information onto the gravity, the origin or the treatment of an infection. For that purpose, it must be both reliable and fast, according to the clinical conditions. The automation of the bacterial identification was based at first on the inclusion of biochemical tests in miniaturized supports, in association with a reading and an interpretation integrated in the system. These systems are the Vitek (bioMérieux), the Phoenix (BD) and the MicroScan (Siemens then Beckman). Although these automations have acceptable performances, they are limited by strains sometimes little reactive and by database reflecting with difficulty the heterogeneity of certain species. It is in particular the case for strictly aerobic species or for species with few reference strains. Since a few years, we attend the advent of the use of the mass spectrometry Maldi-Tof for the identification based on the difference of mass of cellular proteins of which a majority of ribosomal proteins. The performances are superior to that of the phenotypic methods and globally similar between both proposed systems Microflex-Biotyper (Bruker) and Shimadzu-VitekMS (bioMérieux). Some species phylogenetically close are difficult to identify by this technology but these problems are usually well listed. The mass spectrometry Maldi-Tof can identify most of the species with only one strain in the database and the time for the result is reduced to a few minutes. This technology can be also adapted to the direct identification from positive blood cultures.

Automation – identification – phenotypic – mass spectrometry.

pouvoir être identifié de manière fiable et rapide ; quel foyer infectieux septicémique ? Une endocardite à *Streptococcus gallolyticus* orientera vers une origine colique ; quel traitement antibiotique probabiliste ? La plupart des espèces bactériennes ont des résistances naturelles à certains antibiotiques et l'écologie locale doit être prise en compte. Il est donc évident que l'identification réalisée par le laboratoire doit à la fois être fiable pour les bactéries pathogènes et obtenue rapidement afin de prendre en charge efficacement le patient et parfois l'entourage et d'adapter l'antibiothérapie le plus rapidement possible dans le cas d'infections sévères.

L'identification bactérienne peut être réalisée à l'aide de méthodes phénotypiques, immunologiques et/ou moléculaires. Les méthodes phénotypiques sont les plus

anciennes et reposent le plus souvent sur des tests biochimiques comme des tests de fermentation, des tests enzymatiques ou des tests de croissance en milieu minimum. Ces tests étaient initialement unitaires, puis ont été inclus dans des galeries miniaturisées comme les galeries API (bioMérieux). Une évolution des supports de tests biochimiques a consisté en un couplage avec un automate réalisant l'ensemencement des supports des tests biochimiques et la lecture associée à un logiciel d'interprétation. On peut citer ici le Vitek (bioMérieux) et le Phoenix (BD). L'identification en microbiologie clinique a connu une « révolution » depuis quelques années avec l'introduction de la spectrométrie de masse de type « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight* » (MALDI TOF). Cette dernière permet l'obtention d'un résultat en quelques minutes, avec un inoculum très faible et avec des performances élevées. Néanmoins, l'acquisition d'un spectromètre de masse nécessite un volume journalier d'au moins 50 identifications, seuil à partir duquel le coût de l'identification bactérienne et fongique devient inférieur à ceux des galeries d'identification automatisée par technique biochimique. D'autre part, la SM MALDI TOF ne permet pas de séparer des espèces phylogénétiquement proches dont l'identification repose sur quelques caractères phénotypiques comme *Escherichia coli* et *Shigella* sp, *Aeromonas* spp ou les streptocoques oraux. L'identification bactérienne automatisée par galerie biochimique conserve ainsi l'intérêt de pouvoir identifier des espèces génétiquement très proches et d'être réalisée sur les mêmes instruments que l'antibiogramme automatisé avec un niveau acceptable de performances bien que le délai de rendu de résultats soit nettement plus long (6 heures en moyenne).

Il existe d'autre part des identifications basées sur l'analyse des acides gras cellulaires par chromatographie en phase gazeuse et des identifications déterminées après analyse de séquence de gènes conservés notamment celui de l'ARN16S ribosomique. Ces deux techniques ont été automatisées et associées à un logiciel d'interprétation (MIDI pour les acides gras et MicroSeq pour l'ARN16Sr) mais leur usage reste limité en bactériologie médicale et ils ne seront pas traités dans cet article.

2. Les automates d'identification biochimique

2.1. Caractéristiques générales

Ce sont des systèmes automatisés, avec leur étuve intégrée, gérant toutes les étapes de l'identification depuis l'incubation au rendu des résultats. Ils possèdent un système informatique gérant l'automate, assurant la traçabilité des différentes étapes techniques et analytiques et ils possèdent un logiciel permettant la comparaison des résultats avec une base de données intégrée. Ils sont connectables au système informatique de laboratoire (SIL) directement ou via un « middleware » ou concentrateur, ce dernier pouvant réaliser des étapes d'expertises, de centralisation de données analytiques, notamment données de l'antibiogramme, provenant de différentes origines et d'épidémiologie. Ils demandent le passage régulier de souches de référence, attestant de la bonne intégrité du système.

Ceci est un gros avantage dans l'optique de l'accréditation par rapport aux techniques manuelles.

Les supports des substrats d'identification sont différents selon les automates : plaques de 96 puits pour le MicroScan® (Beckman), cartes de 64 compartiments pour les systèmes Vitek® 2 (bioMérieux) et galeries (« panels ») de 136 alvéoles (dont 51 séparées pour l'identification) pour le Phoenix® (Becton Dickinson).

2.2. Principales caractéristiques des différents supports

Les cartes d'identification bactérienne (GP, GN, NH, ANC) sont séparées des cartes d'antibiogrammes sur le système Vitek® 2. Par contre, les plaques du MicroScan® ou les galeries du Phoenix existent sous 3 formats : identifications seules, antibiogrammes seuls ou identification et antibiogramme inclus dans le même support. Les supports combinés ont un délai de résultats plus important en raison de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques qui est plus lente que les identifications réalisées à partir de substrats préformés. Le libellé des supports indique le type de bactéries identifiées. Le choix s'établit sur la base de la coloration de Gram, du type respiratoire, de la morphologie ou du comportement biochimique. Ces précisions sont également importantes dans le choix des antibiotiques testés associés à l'identification. On peut donc signaler l'importance des premiers tests d'orientation qui permettent le choix du support à utiliser, un mauvais choix pouvant donner une identification erronée (exemple : carte gram négatif pour un *Bacillus* décoloré avec fausse identification de *Brucella* spp!).

Le nombre d'espèces dans la base de données est un critère important dans le choix de l'automate.

2.1.1. Tests d'identification et méthodes de lecture

La majorité des tests retenus pour l'identification des espèces est constituée par des tests biochimiques conventionnels miniaturisés dont la révélation diffère par rapport au système traditionnel. La mise à disposition de ces nombreux substrats est un des atouts de l'automatisation. Mais, *a contrario*, ces nombreux substrats et le système de lecture ne permettent pas de contrôler visuellement les résultats.

Trois principes de réactions ou tests demeurent les plus importants : acidification des sucres, recherche d'enzymes type glycosidase et peptidase, les réactions de décarboxylation, hydrolase et phosphatase étant minoritaires. L'utilisation ou non des différents substrats par la bactérie sera détectée par différentes mesures toutes automatisables. Avec les plaques du MicroScan®, les cartes du Vitek® 2 ou les galeries du Phoenix® les substrats sont souvent traditionnels, mais l'originalité réside dans le mode de lecture. Le principe de la fluorescence appliqué à l'identification empêche une lecture visuelle. Il comprend un couplage des substrats à des fluorophores (soit la 4-méthylumbelliférone (4MU) pour la détection des glycosidases, soit la 7-amino-méthyl coumarine (7-AMC) pour la détection des peptidases). La présence d'enzymes libère le composé fluorescent. Pour les autres réactions (alcalinisation ou acidification), une mesure de l'extinction de fluorescence est effectuée. Il peut être proposé des tests additionnels à réaliser en plus des supports commercialisés afin de

séparer des taxons avec des résultats similaires pour les tests inclus dans les galeries ou cartes d'identification.

2.1.2. Caractéristiques des bases de données des bactéries à Gram positif

Les bases de données des trois systèmes (**tableau I**) regroupent surtout les deux familles de cocci : Streptococcaceae et Micrococcaceae, avec des différences dans le nombre d'espèces identifiables dans chaque genre. La galerie PID utilisée par le Phoenix® a une particularité : en effet, en plus de *Listeria* identifiable également par le MicroScan® et le Vitek®, les genres *Arcanobacterium*,

Corynebacterium et *Erysipelothrix* sont inclus dans sa base de données. Les automates MicroScan® et Vitek® 2 incluent aussi des espèces des genres *Listeria* et *Rothia*. La carte GP du Vitek® 2 inclut d'autres genres bactériens comme *Globicatella*, *Helcococcus*, *Facklamia*, *Abiotrophia* et *Granulicatella*.

2.1.3. Caractéristiques des bases de données des bactéries à Gram négatif

La distinction porte classiquement en entérobactéries ou non-entérobactéries ou en Gram négatif fermentant et Gram négatif non fermentant (**tableau II**). Là encore le chiffre brut

Tableau I : Nombre de taxons à Gram positif identifiés par les différents supports.

Bactéries	Microscan® WalkAway® Beckman		Vitek® 2 bioMérieux	BD Phoenix® Becton Dickinson
	Conventional Pos ID 45 tests	Rapid Pos ID 34 tests	ID-GP 43 tests	PID 46 tests
<i>Streptococcaceae</i>	25	19	68	57
<i>Aerococcus</i>	2	1	2	2
<i>Alloiooccus</i>	–	–	1	1
<i>Enterococcus</i>	7	4	11	8
<i>Gemella</i>	1	1	4	2
<i>Lactococcus</i>	–	–	4	6
<i>Leuconostoc</i>	1	–	6	5
<i>Streptococcus</i>	13	13	38	28
<i>Pediococcus</i>	1	–	2	5
<i>Micrococcaceae</i>	23	26	32	36
<i>Dermacoccus</i>	–	–	1	1
<i>Kocuria</i>	1	2	3	3
<i>Micrococcus</i>	1	1	1	2
<i>Staphylococcus</i>	20	23	26	29
<i>Stomatococcus</i>	1	–	1	1
<i>Bacilles à Gram positif</i>	1	1	7	33
<i>Arcanobacterium</i>	–	–	–	2
<i>Corynebacterium</i>	–	–	–	15
<i>Erysipelothrix</i>	–	–	1	1
<i>Listeria</i>	1	1	6	5
<i>Rhodococcus</i>	–	–	–	1
<i>Bacillus</i>	–	–	–	9
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	–	–	1
<i>Gardnerella</i>	–	–	1	1
Autres genres	1	1	11	12
Total	51	47	119	140

Tableau II : Nombre de taxons à Gram négatif identifiés par les différents supports.

Bactéries	Microscan® WalkAway® Beckman		Vitek® 2 bioMérieux	BD Phoenix® Becton Dickinson
	Conventional Neg ID 47 tests	Rapid Neg ID 36 tests	ID GN 48 tests	NID 45 tests
BGN fermentant	77	95	85	85
Entérobactéries	63	75	69	68
Non entérobactéries	14	20	16	17
BGN non fermentant	32	41	55	74
Pseudomonadaceae	6	8	9	13
Non Pseudomonadaceae	26	33	46	6188
<i>E. corrodens</i>		1		1
<i>C. hominis</i>				1
<i>M. catarrhalis</i>				1
Total	109	137	140	162

d'espèces identifiables sépare le Phoenix® des deux autres automates (supérieur à trois cents contre une centaine pour les deux autres). Les bactéries suivantes : anaérobies, *Haemophilus*, *Neisseria* ne sont pas identifiables par le Phoenix®. Le MicroScan® propose un support spécifique HNID pour les *Neisseria*, *Haemophilus* et *Moraxella catarrhalis* et un support spécifique pour les anaérobies. De plus, le système Vitek® 2 dispose d'une carte «NH» pour l'identification en 6 heures des bactéries exigeantes : HACEK, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* et d'une carte «ANC» permettant l'identification de quelques corynébactéries et d'anaérobies.

2.3. Les étapes de l'identification automatisée

Les deux premières phases obligatoires de l'identification automatisée sont la préparation de l'inoculum et sa distribution. Une différence entre eux apparaît au niveau de la distribution de l'inoculum qui est automatisée pour le Vitek® et pour le système Phoenix s'il est couplé avec l'automate AutoPrep® mais elle est manuelle pour le MicroScan® (système Renok®).

La densité bactérienne correspondant à l'inoculum de départ est étalonnée vis-à-vis d'une gamme de McFarland ou d'un densitomètre.

Une fois ensemencés les supports seront incubés dans l'étuve interne des automates. La température d'incubation est de 35-37 °C. La durée d'incubation est variable selon les instruments, les espèces à identifier et la taille de l'inoculum. Elle est obligatoirement fixée à 2 heures pour le MicroScan® et varie de 2 (Gram positif) 3 heures (Gram négatif) à 6 heures (ANC et NH) pour le Vitek® 2. Il s'étend de 2 à 6 heures pour le Phoenix® avec des temps différents pour les galeries combo (identification-antibiogramme) par rapport à une identification seule.

La rapidité de lecture dépend de différents facteurs : la taille de l'inoculum, l'agitation des dispositifs ensemencés, l'analyse informatique des lectures très fréquentes des tests et les systèmes de détection de la positivité des réactions. Le délai de réponse s'en trouve très raccourci (2 à 6 heures) bloqué ou non selon les automates. Ils peuvent être plus longs avec les bacilles à Gram négatif non fermentants ou avec certains bacilles à Gram positif. Des messages d'erreurs peuvent apparaître en cas de problèmes de lecture des tests (inoculum insuffisant, nombre de lectures insuffisantes, tests majoritairement négatifs...) qui obligent à refaire l'identification par le même système ou par une autre technique si le problème se renouvelle. Le Vitek® donne une liste d'espèces normalement «non réactives» qui peuvent être faussement identifiées en cas de tests majoritairement négatifs ou incertains.

L'interprétation des tests est automatisée. L'appareil compare le profil obtenu de la souche inconnue avec ceux de sa banque de données. Les résultats test par test sont également disponibles, permettant parfois de les utiliser pour les comparer avec la littérature. Un test positif est toujours plus pertinent qu'un test négatif qui peut résulter d'une croissance ou d'une «activité» faible de la souche. Les résultats sont exprimés soit en excellente (96 à 99 % de probabilité), très bonne (93 à 95 %), bonne identification (89 à 92 %) et identification acceptable (85 à 88 %) pour le Vitek®, soit en probabilité la plus élevée ($\geq 85\%$),

en probabilité faible ($< 85\%$), ou en biotype rare (VRB) pour le système Microscan®, qui peut aussi proposer une probabilité élevée ($\geq 85\%$) pour un genre ou groupe bactérien. Une seule identification est proposée avec une valeur de confiance entre 90 et 99 % (Phoenix®). En cas de doute l'appareil peut demander des tests complémentaires, rallongeant éventuellement le temps d'identification. Il peut alors ré-interpréter les résultats.

Les automates demandent le passage régulier de souches de référence comme contrôles de qualité interne. Le laboratoire doit aussi avoir un contrat avec un laboratoire fournissant régulièrement des souches pour évaluations externes de qualité.

2.4. Performances d'identification

Les systèmes automatisés phénotypiques ([tableau III](#)) ont des performances comparables mais montrent un nombre d'erreurs assez important quand on se réfère aux méthodes moléculaires.

Une étude par méta-analyse comparative VITEK® 2 *versus* Phoenix® portant sur 147 souches de staphylocoques a montré une supériorité du VITEK 2 par rapport au Phoenix [1]. De même, l'étude de Farh et al. [2] portant sur 275 souches de staphylocoque, 179 souches d'entérocoques et 15 souches de streptocoques retrouve 97,1 %, 98,9 % et 100 % d'identifications concordantes par rapport aux identifications de routines obtenues en ID32 staph®; ID32 Strept® ou VITEK® 2. Néanmoins, comparés aux méthodes moléculaires de type PCR/Séquençage du gène 16S, ou du gène de ménage tuf, les identifications biochimiques des staphylocoques non aureus apparaissent de performances moindres. Récemment, l'étude de Dupont et al. [3] a comparé les performances de la spectrométrie de masse MALDI TOF, du Phoenix® et du VITEK® 2 pour l'identification des souches de staphylocoques appartenant à 20 espèces différentes. Utilisant un référentiel moléculaire, cette étude démontre la supériorité de la spectrométrie de masse par rapport au Phoenix® et au VITEK® 2.

Les streptocoques et les entérocoques sont globalement bien identifiés par les automates phénotypiques, les streptocoques oraux incluant le pneumocoque étant néanmoins moins bien identifiés avec moins de 90 % d'identifications correctes. Concernant les Entérobactéries, les performances sont globalement satisfaisantes pour les automates phénotypiques. Une comparaison entre les systèmes Phoenix® et MicroScan WalkAway® pour l'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentant montre d'excellentes performances avec 98,7 et 97,7 % ; 100 % et 97,7 % d'identification correctes pour les systèmes Phoenix® et MicroScan WalkAway® respectivement.

2.5. Les autres caractéristiques de choix des automates

Les automates WalkAway® et Phoenix® proposent des plaques éventuellement combinées, dites « combo », regroupant l'identification et l'antibiogramme. Le Vitek® possède des cartes séparées mais les résultats de lecture sont interprétés conjointement. Les performances de l'antibiogramme peuvent également impacter le choix de l'automate d'identification automatisée.

Tableau III : Performances des différents automates (% d'identification correcte).

Famille bactérienne	Nombre de souches	Comparateur	Phoenix®	Vitek® 2	MicroScan®	Référence
Toutes bactéries	806	Spectrométrie de masse et ARN 16S	/	96,4%	/	Jamal [5]
Staphylocoques coagulase négative	142	Spectrométrie de masse et ARN 16S	/	92,3%	/	Loonen [6]
<i>Staphylococcus</i> Spp	57	ARN 16S et tuf	63,1 %	/	/	Heikens [17]
<i>Staphylococcus</i> Spp	234	SodA	75,6 %	75,2 %	/	Dupont [3]
<i>Staphylococcus</i> Spp	113	RFLP gap	77,9 %	88,5 %	/	Layer [18]
Entérobactéries	493	VITEK® 2	/	/	97,0%	Rhoads [19]
Non entérobactéries	301	VITEK® 2	/	/	71,4%	Sung [20]
<i>Enterococcus</i> spp	179	VITEK® 2	98,9 %	/	/	Fahr [2]

L'automate doit être connecté au SIL ou à un système « Middleware » qui assure la concentration, l'expertise et/ou les analyses épidémiologiques des résultats avant transmission au SIL. Un système expert existe pour l'ensemble des automates permettant de valider l'identification à l'antibiogramme (Advanced Expert Sytem du Vitek® 2 basée sur des règles d'expertise fondée sur les données bibliographiques, BD Epicenter® associé avec le Phoenix®). Il peut être plus ou moins performant. Il est généralement possible de modifier ou rajouter des règles d'expertise interne.

Une amélioration des bases de données ou un affinement de la taxonomie bactérienne est régulièrement nécessaire.

3. Spectrométrie de masse par Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization (MALDI) – Time of Flight (TOF)

La spectrométrie de masse par Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization (MALDI) – Time of Flight (TOF) est une technologie qui analyse majoritairement les protéines ribosomales qui sont présentes en nombre suffisant chez toutes les bactéries. Ces protéines présentent une diversité importante mais avec une conservation suffisante qui permet de différencier les espèces par un profil protéique particulier. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (SM-MT) s'avère donc plus robuste que les identifications phénotypiques traditionnelles pouvant être prises en défaut dans le cas d'une mutation ponctuelle ou d'une expression faible d'activités enzymatiques pour des souches déficientes. Par contre, les espèces phylogénétiquement proches sont parfois peu différenciables par SM-MT [4].

3.1. Principe et utilisation de la SM-MT

Le principe est basé sur la transformation des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux afin d'obtenir leur masse moléculaire par analyse du rapport

masse/charge (M/z). La technologie MALDI-TOF utilise une matrice cristalline pour la préservation de l'intégrité des molécules au cours des procédures d'analyses (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization*). Les cristaux de la matrice absorbent l'énergie photonique du laser d'azote, effectuant la désorption et une ionisation (douce) des protéines qui permet leur séparation dans un champ électrique, chaque molécule étant définie par le temps de vol (*Time of Flight*). La gamme des m/z mesurés va de 1 000 à 20 000, soit de 1 à 20 kDa. L'identification et la classification des bactéries par l'analyse des protéines ribosomales séparées par SM-MT à l'avantage que l'analyte détecté est lié à l'identité génétique du microorganisme. En plus, la préparation de l'échantillon est simple et l'acquisition de données et leur analyse est extrêmement rapide.

Pour la culture des isolats, il est conseillé d'utiliser les types de milieux et les conditions de croissance recommandés par les fournisseurs. Il existe 3 techniques de dépôts qui sont proposées : la première consiste en une extraction protéique préalable par éthanol, acide formique et acétonitrile nécessitant deux étapes de centrifugation. La deuxième technique est le dépôt direct sur la cible d'une petite partie de colonie sans aucune extraction préalable. Enfin la troisième méthode propose d'ajouter de l'acide formique à la masse bactérienne directement au niveau du spot sur la cible. En pratique, les bactéries de bonnes croissances (entérobactéries, staphylocoques par exemple) sont analysées par dépôts simples, alors que les levures, actinomycètes, bactéries anaérobies nécessitent souvent une extraction complète ou au moins l'ajout d'acide formique sur le dépôt. L'identification des mycobactéries nécessite une étape supplémentaire de lyse avec des protocoles souvent définis par les fournisseurs.

3.2. Les différents spectromètres de masse

3.2.1. Le Microflex LT Maldi-Biotyper (Bruker®)

Le logiciel Maldi-Biotyper® compare le spectre obtenu avec les différents spectres de références correspondants à chaque souche de la base de données. Il n'existe donc

pas de profil type par espèce avec ce système. Le nombre de souches par espèces dans la base de données est très variable et peut-être constitué que d'une seule souche pour des espèces rares. Le résultat de l'identification apparaît sous la forme d'un score d'homologie entre le spectre obtenu et les 10 spectres de référence identifiés comme les plus proches. Les résultats font intervenir deux paramètres, tout d'abord le score qui est donné en Log de 1,000 à 3,000. Le fournisseur recommande d'accepter l'identification d'espèce seulement pour un score de la première proposition supérieur à 2,000, et l'identification de genre pour un premier score entre 1,700 et 1,999. Le deuxième paramètre est la cohérence à l'espèce ou au genre rendue par les lettres A, B ou C qui repose sur le nombre d'espèces ou de genres identiques proposés pour l'identification du micro-organisme parmi les dix spectres les plus similaires. En pratique, la majorité des souches en routine de bactériologie médicale obtiennent des scores supérieurs à 2,000 avec une seule espèce proposée pour un tel score. Cependant, un certain nombre d'identifications peut donner des scores proches pour des espèces différentes notamment dans le cas de taxons formant des groupes ou des complexes d'espèces (*Enterobacter* complexe *cloacae*, *Burkholderia* groupe *cepacia* par exemple). Il est alors nécessaire pour chaque laboratoire de définir des recommandations internes pour la conduite à tenir en face de tels résultats, en regard de l'intérêt à différencier ces espèces phylogénétiquement proches. D'autre part, un score supérieur à 2,000 est parfois difficile à obtenir pour des souches de croissance faible (staphylocoques déficients, anaérobies, bactéries « fastidious ») ou pour des espèces génomiquement hétérogènes. Dans ce cas-là, il a été montré qu'une identification pouvait être fiable même avec des scores compris entre 1,700 et 1,999 sous certaines conditions notamment un différentiel de score > à 10 % entre celui de la première espèce proposée et celui de la deuxième espèce proposée parmi les 10 propositions du logiciel.

3.2.2. Le Vitek-MS (bioMérieux®)

Ce système utilise un spectromètre de masse de marque Shimadzu. Deux bases de données sont disponibles : la base CE-IVD et la base RUO. La base CE-IVD est constituée par des souches représentant les espèces bactériennes (en moyenne 18 isolats par espèce) qui sont analysées sur la base d'une étude de population afin de révéler les caractéristiques communes des spectres au sein d'une espèce. Le spectre de chaque souche obtenu par une centaine de tirs est ainsi comparé et obtient un score de confiance pour une espèce donnée. On estime qu'un minimum de 60 % de confiance à l'espèce est un score acceptable. Pour un score inférieur, il convient de vérifier l'identification proposée par une autre technique notamment la comparaison avec la base ouverte RUO. Celle-ci est basée sur l'existence de « superspectres » créés à partir des pics communs par espèce et sur la possibilité de comparaison vis-à-vis de chacune des souches de référence de cette base de données. Il est considéré comme identification acceptable pour les superspectres un résultat supérieur à 80 % de confiance.

Pour un résultat inférieur à ce seuil, la souche à identifier peut être comparée avec chacune des autres souches de la base RUO.

3.2.3. Le système LT2 Andromas®

Il s'agit d'un logiciel contenant une base de données de spectres obtenus dans différentes conditions (milieux de culture, temps d'incubation) et définissant ainsi les pics caractéristiques d'une espèce. La banque de données est constituée d'un nombre restreint de pics pour chaque espèce bactérienne et il existe pour chaque espèce bactérienne une seule ou un nombre restreint d'entrées. Ce système expert est compatible avec les spectromètres de masse distribués par Bruker et bioMérieux. Le dispositif Andromas comprend quatre modules (Bactérie hors mycobactérie, Mycobactérie, Champignon hors dermatophytes, dermatophytes) réunis dans une seule base de données mise à jour régulièrement.

3.3. Performances de la SM-MT

- Comparaisons de la SM-MT avec les méthodes phénotypiques d'identification. (*tableau III et IV*)

Une étude a comparé les performances d'identification de 2 systèmes SM-MT (Vitek MS et Maldi-Biotyper) avec celles du Vitek® 2 (bioMérieux) à partir d'un total de 806 souches cliniques appartenant aux différents groupes bactériens [5]. Les automates de SM-MT ont obtenu une bonne identification de genre et d'espèces de 97,3 % et 93,2 %, et de 99,8 % et 99,0 % pour respectivement le Maldi Biotyper et le Vitek MS. Comparativement le Vitek® 2 a donné 98,6 % et 96,4 % de bonne identification. Le principal problème rencontré a été les erreurs du Maldi Biotyper pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae* (18 erreurs sur 26 souches testées) ce qui explique en partie les résultats globaux similaires entre la MS-MT et la méthode phénotypiques. Toutes les études soulignent le gain de temps très important apporté par l'utilisation de la SM-MT. Une autre étude a comparé les performances des méthodes biochimiques Vitek® 2 avec celles de la spectrométrie de masse en utilisant le Maldi Biotyper et des séquences ADN 16S et tuf pour l'identification des staphylocoques [6]. Les résultats montrent une identification d'espèce correcte pour 99,3 % des 142 souches testées par la technique SM-MT contre 92,3 % pour respectivement le Vitek® 2.

3.3.1. SM-MT et bactéries Gram positif

Martiny et al. ont comparé les 2 systèmes MS-MT Maldi-Biotyper et Vitek-MS pour l'identification de 247 souches de staphylocoques [7]. Les performances obtenues sont similaires avec 94 % de bonne identification d'espèces. La base de données RUO plus complète permet d'obtenir 96 % d'identification correcte. Une autre étude a comparé les performances des méthodes biochimiques Vitek® 2 et API (BioMérieux) avec celles de SM-MT en utilisant le Maldi Biotyper [6]. Les résultats montrent une identification d'espèce correcte pour 99,3 % des 142 souches testées par la technique SM-MT contre 92,3 % et 85,9 % pour respectivement le Vitek® 2 et l'API 32 Staph. Ces études démontrent que l'identification des staphylocoques est très bien réalisée par les systèmes SM-MT.

Tableau IV: Performances de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification.

	Nombre de souches (nombre de taxons)	BioMérieux Vitek MS		Bruker Maldi-Biotyper		Références
		Identifications correctes par niveau taxonomique (%)		Identifications correctes par niveau taxonomique (%)		
		Genre	Espèce	Genre	Espèce	
Staphylocoques	247 (11)	94 % (VMS) 96 % (RUO)	94,0 % (VMS) 96 % (RUO)	97,6 %	94 %	Martiny [7]
Streptocoques	71 (8)	89 %	87,3 %	77 %	64,8 %	Martiny [7]
Entérocoques	132 (4)	100 %	100 %	100 %	100 %	Fang [8]
Corynébactéries	116 (18)	-	-	100 %	99 %	Konrad [9]
Bacilles Gram +	206 (51)	84,6%	56%	-	-	Navas [10]
Mycobactéries	157 (44)	-	89,2 %	-	84,7 %	Wilen [12]
Entérobactéries	485 (21)	94 %	93 %	97 %	96 %	Martiny [7]
Entérobactéries	365 (15)	100 %	99,5 %	99,2 %	99,2 %	Jamal [5]
Gram négatif non fermentant	200 (27)	93 %	80 %	97 %	72,5 %	Marko [13]
Anaérobies	73 (26)	78 %	75,3 %	83,5 %	61,6 %	Martiny [7]
Levures candida	157 (30)	93,7 %	87,3 %	93,6 %	92,3 %	Mancini [14]
Autres levures	40 (15)	85 %	72,5 %	80 %	80 %	Mancini [14]

À partir d'une étude de 71 souches de streptocoques, le Vitek-MS a présenté les meilleures performances avec 87,3 % de bonne identification d'espèces contre seulement 64,8 % pour le Maldi-Biotyper [7], la différence étant essentiellement due à de mauvaises performances pour l'identification de *S. pneumoniae* par le Maldi-biotyper (6/15 souches correctement identifiées contre 12/15 souches pour le Vitek-MS). Les entérocoques les plus fréquemment rencontrés y compris ceux avec un phénotype *vanC* sont très bien identifiés par la SM-MT quel que soit le système utilisé [5, 8].

Deux études utilisant le Maldi-biotyper ont montré d'excellentes performances pour l'identification des corynébactéries. Konrad et al. [9] ont obtenu 99 % d'identification correcte par le Maldi-Biotyper contre 89,7 % pour le système biochimique API Coryne (BioMérieux). La totalité des 90 souches potentiellement porteuses d'une toxine diphtérique ont été correctement identifiées. Le système Vitek-MS donne des résultats inférieurs selon l'étude de Navas et al. [10] qui ont obtenu à partir de 121 souches de *Corynebacterium* sp 72,7 % et 92,6 % d'identification correcte respectivement au niveau de l'espèce et du genre. *Listeria monocytogenes* est correctement identifiée par la SM-MT avec 100 % de bonne identification pour les deux systèmes si on accepte quelques souches avec un score légèrement supérieur à 1,8 pour le Maldi-Biotyper [10]. La différenciation entre *L. monocytogenes* et *L. ivanovi* est faible par le système Maldi-Biotyper [5].

À partir d'une étude avec 659 souches, 16 genres et 72 espèces, le système Andromas montre d'excellentes performances pour l'identification des bacilles à Gram positif avec 98,5 % d'identifications correctes au niveau de l'espèce [11].

Concernant le genre *Bacillus*, les espèces *B. cereus* et *B. anthracis* sont mal séparées par la SM-MT utilisant les systèmes proposés en microbiologie de routine et nécessitent des tests additionnels pour les différencier (mobilité et pouvoir hémolytique pour les tests les plus accessibles).

3.3.2. SM-MT et mycobactéries

Elles peuvent être identifiées par SM-MT après une préparation particulière visant à inactiver la souche et à extraire les protéines. D'autre part, les performances d'identification sont supérieures pour des bactéries en culture sur milieux gélosés comparativement à des cultures en milieux liquides telles que les MGIT. Wilen et al. [12] ont comparé les performances d'identification des 3 systèmes Maldi-Biotyper, Vitek-MS et Vitek-MS plus (Saramis) à partir de 157 souches de mycobactéries dont 16 *M. tuberculosis* cultivées sur milieux gélosés Middlebrook 7H10. Le Maldi-Biotyper identifie correctement 84,7 % des souches en utilisant un seuil de score supérieur à 1,8, et ne donne pas d'erreurs pour les 15,3 % de souches restantes. Le système Vitek-MS donne une bonne identification (valeur supérieure à 90 %) pour 89,2 % des souches avec une seule erreur parmi les autres souches et le système Vitek-MS-Plus permet d'obtenir 85,4 % d'identification correcte avec également une seule erreur parmi les autres souches. Il est à noter que les protocoles de préparation protéiques respectifs recommandés par les fabricants ne peuvent être échangés entre les différents systèmes testés. Les 3 systèmes évalués dans cette étude montrent une identification correcte pour 100 % des souches du complexe *M. tuberculosis*. Les systèmes commercialisés ne permettent pas la différenciation des espèces de ce complexe *tuberculosis*.

3.3.3. SM-MT et Bactéries Gram négatifs

La plupart des espèces rencontrées en routine de bactériologie médicale sont bien identifiées par les systèmes basés sur des tests biochimiques. La SM-MT permet cependant l'identification supplémentaire de certaines espèces peu courantes mais cette technologie présente cependant des limites concernant des espèces phylogénétiquement proches. Globalement, les performances en routine de la SM-MT pour les entérobactéries sont proches de 100 % d'identifications correctes, comparables avec les systèmes automatisés

d'identification biochimique mais dépendent de la population bactérienne étudiée et du niveau d'identification requis, la notion de complexe d'espèces étant ici très importante. Les restrictions de l'utilisation de la SM-MT concernent surtout l'absence de différenciation entre *E. coli* et *Shigella* sp dont on sait qu'elles constituent une seule espèce génomique ainsi que la difficulté de différencier des espèces au sein des complexes d'espèce existant dans ce groupe bactérien (complexe *Citrobacter freundii*, complexe *Enterobacter cloacae*). L'identification différentielle des espèces *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica* et *Klebsiella oxytoca* nécessitent le plus souvent un recours à des tests biochimiques. L'identification des souches d'*E. coli* lactose négative nécessitent aussi des tests complémentaires biochimiques ou antigéniques afin de les différencier des *Shigella* spp.

Les espèces pathogènes ainsi que les espèces environnementales de *Vibrio* sont correctement identifiées par SM-MT alors que le genre *Aeromonas* contient de nombreuses espèces très proches phylogénétiquement l'une de l'autre avec plus de 99 % d'homologie de l'ARN ribosomique 16S. Les bacilles Gram négatifs aérobies stricts forment des espèces dont pour certaines d'entre elles une grande proximité phylogénétique oblige de les définir sous la forme de complexes ou de groupes d'espèces. Marko et al. [13] ont comparé deux systèmes de SM-MT pour l'identification des bacilles aérobies stricts isolés de manière consécutive de patients mucoviscidosiques. Les systèmes Vitek-MS et Maldi Biotyper identifient correctement le genre bactérien pour respectivement 93 % et 97 % des bactéries. Concernant l'identification d'espèces, le pourcentage de résultats corrects est de 80 % et de 72,5 % pour respectivement le système Vitek-MS et le système Maldi-Biotyper. Les espèces du complexe *Burkholderia cepacia* sont peu différenciables. Parmi les bacilles aérobies stricts, les espèces des genres *Achromobacter* et *Stenotrophomonas* sont également peu identifiables entre elles par la SM-MT. Les espèces isolées en bactériologie médicale appartenant au genre *Acinetobacter* sont bien identifiées par SM-MT y compris au sein du complexe *A. baumannii*.

Les espèces pathogènes du genre *Neisseria* (*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*) sont correctement identifiées par la SM-MT mais les autres espèces sont peu différenciables entre elles et certaines souches de *Neisseria* non pathogènes peuvent donner une fausse identification comme *N. meningitidis*. Il peut être recommandé de confirmer une identification de *N. meningitidis* par des tests phénotypiques, antigéniques ou moléculaires.

Le genre *Haemophilus* est correctement identifié au niveau de l'espèce, les systèmes Vitek-MS et Maldi Biotyper ayant intégré *H. haemolyticus* dans leur base de données.

3.3.4. SM-MT et bactéries anaérobies

Les performances de la SM-MT pour l'identification des bactéries anaérobies sont un peu inférieures à celles obtenues pour les bactéries aérobies, les raisons étant à la fois taxonomiques, avec encore beaucoup d'espèces de statuts incertains et aussi métaboliques avec des croissances plus faibles. Le pourcentage d'identification correcte se situe en moyenne autour de 80 % pour le genre et varie pour l'espèce de 62 % pour le Maldi-Biotyper à 75 % pour le Vitek-MS [7]. L'utilisation d'un score supérieur à 1,8 pour

une identification d'espèce et l'emploi d'une extraction protéique préalable permettent d'améliorer les performances.

3.3.5. SM-MT et levures

À partir de 197 souches de levures, Mancini et al. [14] ont obtenu des performances similaires pour les deux systèmes Maldi Biotyper et Vitek-MS avec respectivement 89,8 % et 84,3 % d'identifications correctes. Les résultats concernant les levures du genre *Candida* et apparentés sont de 92,3 % et 87,3 % d'identifications correctes et pour les autres levures de 80,0 % et 72,5 % respectivement pour le Maldi Biotyper et le Vitek-MS. Les erreurs d'identifications sont plus nombreuses concernant le Vitek-MS.

Les espèces du genre *Aspergillus* sont bien identifiées par la SM-MT.

3.3.6. Identification directe par SM-MT à partir d'échantillons cliniques

Cette technique est très séduisante puisqu'elle permet potentiellement d'identifier très rapidement dans un contexte de routine quasiment d'intérêt médical toutes les bactéries contenues dans un liquide biologique à condition qu'elles soient en nombre important. La SM-MT peut être utilisée pour identifier les bactéries présentes dans les urines dans le cadre d'une infection urinaire. Il est nécessaire de passer par une étape de centrifugation et d'extraction afin d'éliminer les cellules et protéines se trouvant dans les urines de patients infectés. Les performances montrent une identification correcte pour près de 95 % des bactéries contenues dans les urines dans le cas d'une présence d'au moins 105 ufc/ml. La principale utilisation de la SM-MT à partir des prélèvements concerne les hémocultures positives après incubation [15]. Chen et al. [16] ont comparé les performances de deux systèmes commercialisés incluant une standardisation de la préparation bactérienne. Les deux systèmes Maldi-Biotyper et Vitek-MS montrent une identification correcte de l'espèce qui est similaire (81,8 % et 80,7 % respectivement) alors que le Maldi-Biotyper identifie plus de bactéries au niveau du genre seul (16,0 % contre 12,2 % pour le Vitek-MS). Une alternative intéressante à l'identification directe et qui nécessite beaucoup moins de manipulations est l'identification à partir des microcolonies récupérées sur milieux gélosés après seulement quelques heures d'incubation. En dehors de l'aspect financier, le choix des modalités de prise en charge d'une hémoculture positive à l'aide de la SM-MT se fait sur la base du personnel disponible au laboratoire durant la totalité des heures ouvrables et de la réceptivité d'un tel résultat dans les services cliniques, notamment pendant les horaires de garde.

3.4. Utilisation en routine de la SM-MT

En pratique, les identifications sont effectuées en récupérant une colonie à partir des géloses puis en effectuant un dépôt direct. En cas de score insuffisant, un deuxième passage après extraction est alors envisagé. Dans le cas où l'identification n'est pas encore acceptable, un examen direct associé à quelques tests rapides (mobilité, catalase, oxydase, ou autres tests enzymatiques) permet de s'orienter vers une identification générique souvent suffisante pour renseigner le clinicien (*Lactobacillus* spp, *Bacillus* spp, *Actinomyces* spp...). L'utilisation d'automates d'identification

phénotypique reste intéressante pour certaines espèces proches dont l'identification dépend d'un ou de deux tests phénotypiques, l'exemple le plus important étant l'identification différentielle entre *E. coli* et *Shigella* spp. L'identification moléculaire reste utile en dernier recours mais son utilisation tend à diminuer depuis l'avènement de la SM-MT.

4. Conclusion

Les performances de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des bactéries et des organismes fongiques sont excellentes et globalement supérieures à celles obtenues par les méthodes phénotypiques traditionnelles automatisées. Les limites de la SM-MT sont maintenant bien connues et prévisibles et donc facilement contournables. L'identification biochimique automatisée reste cependant encore utilisée dans de nombreux laboratoires de biologie médicale.

Ces automates d'identification biochimique permettent d'avoir une méthode mieux standardisée que les galeries d'ensemencement manuel et de lecture parfois visuelle, incluant des contrôles de qualité qui en font des appareils encore adaptés aux considérations de qualité exigée. De plus, la connexion avec le SIL est de règle et ces automates peuvent même dans certains laboratoires faire office de

concentrateur. D'autre part, bien que les performances soient inférieures à celles de la SM-MT et les résultats beaucoup moins rapides, ces automates d'identification biochimique permettent dans certains cas de pallier les difficultés d'identification d'espèces observées par la SM-MT (*Shigella/E. coli*, pneumocoques/streptocoques oraux par exemple).

Les automates d'identification doivent pouvoir s'intégrer dans l'architecture logicielle existante du laboratoire, comprenant entre autres le SIL, les concentrateurs, les automates d'antibiogramme, les logiciels d'épidémiologie qui proviennent souvent de fournisseurs différents.

L'introduction dans un laboratoire d'un nouvel automate d'identification notamment de SM-MT constitue une sorte de révolution culturelle surtout pour le personnel précédemment habitué à des identifications par l'utilisation de tests phénotypiques multiples. Enfin, il est nécessaire de prévoir un recours dans le cas d'un appareil hors service (deux automates en miroir, SM-MT couplé à automate traditionnel, autre laboratoire partenaire...). Le choix final d'un ou de deux automates d'identification se fera en fonction de la prise en compte de tous ces paramètres.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Chatzigeorgiou KS, Sergentanis TN, Tsiodras S, et al., Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2011. 49:3284-3291.
- [2] Fahr AM, Eigner U, Armbrust M, et al., Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2003. 41:1135-1142.
- [3] Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, et al., Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect.* 2010. 16:998-1004.
- [4] Lavigne JP, Riegel P. Mass spectrometry in bacteriology. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015. 73:113-25.
- [5] Jamal W, Albert MJ, Rotimi RO. Real-time comparative evaluation of bioMérieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria. *BMC Microbiol.* 2014. 14:289.
- [6] Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB et al., Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2012. 50:1437-1439.
- [7] Martiny D, Busson L, Wybo I, et al., Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012. 50:1313-1325.
- [8] Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, et al., Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012. 31:3073-3077.
- [9] Konrad R, Berger A, Huber I, et al., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria associated bacteria. *Euro Surveill.* 2010. 15(43):pii19699.
- [10] Navas M, Pincus DH, K. Wilkey, et al., Identification of aerobic Gram-positive bacilli by use of Vitek MS. *J Clin Microbiol.* 2014. 52:1274-7.
- [11] Farfour E, Leto J, Barritault M, et al., Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol.* 2012. 50(8):2702-7.
- [12] Wilen CB, McMullen AR, Burnham CA. Comparison of sample preparation, instrumentation platforms, and contemporary commercial databases for MALDI-TOF MS identification of clinically relevant mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2015. May 13. pii: JCM.00567-15. [Epub ahead of print]
- [13] Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, et al., Evaluation of the Bruker Biotyper and VitekMS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2012. 50:2034-2039.
- [14] Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, et al., Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol.* 2013. 51(7):2453-7.
- [15] Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90 % of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010. 16:1631-8.
- [16] Chen JHK, Ho PL, Kwan GSW, et al., Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol* 2013. 51:1733-1739.
- [17] Heikens E, Fleer A, Paauw A, et al., Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2005. 43:2286-28]
- [18] Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, et al., Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006. 44:2824-2830.
- [19] Rhoads S, Marinelli L, Imperatrice CA, et al., Comparison of MicroScan WalkAway system and Vitek system for identification of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 1995. 33:3044-3046.
- [20] Sung LL, Yang DI, Hung CC, et al., Evaluation of autoSCAN-W/A and the Vitek GNI+ AutoMicrobic system for identification of non-glucose-fermenting gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2000. 38:1127-1130.

Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie

Claudine Quentin-Noury^a

RÉSUMÉ

L'automatisation de l'antibiogramme a connu un développement considérable depuis les années 1980. Actuellement en France, l'automatisation de la méthode par diffusion repose sur des lecteurs automatiques de diamètres de zones d'inhibition comme l'Adagio et la gamme Sirscan. La méthode par microdilution en bouillon peut être réalisée avec des microplaques contenant des dilutions sériées d'antibiotiques prêtes à l'emploi (Sensititre, Microscan) et des systèmes semi-automatisés incluent un lecteur automatique de CMI (Optiread, Autoscan 4). Des systèmes entièrement automatisés, qui gèrent l'incubation, la décision de lecture et la lecture elle-même, sont proposés. Ces automates à antibiogramme comprennent des systèmes qui sont une adaptation directe de la méthode de référence, comme le MicroScan WalkAway et l'ARIS 2X. Le Phoenix s'en rapproche (lecture colorimétrique de la croissance bactérienne, incubation d'environ 12 h). Le Vitek2 est basé sur un principe différent (calcul des CMI à partir d'un algorithme appliqué à la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique, incubation de 6-8 h). L'automatisation de l'antibiogramme a considérablement réduit le temps de travail et, pour les systèmes rapides, accéléré la réponse au clinicien. De plus, l'automatisation a significativement amélioré la fiabilité des résultats grâce à la standardisation des réactifs et de la procédure et à l'informatisation qui évite les erreurs de catégorisation et de transcription. L'exactitude des systèmes (semi)automatisés est satisfaisante pour *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries. Des progrès sont nécessaires pour les autres bactéries non exigeantes. La méthode par diffusion reste indispensable pour les espèces à croissance difficile.

Antibiogramme – automatisation.

1. Introduction

L'antibiogramme consiste à classer les bactéries dans l'une des trois catégories cliniques, sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R), vis-à-vis d'une série d'antibiotiques. La procédure consiste en trois étapes : (i) détermination du seuil de sensibilité de la bactérie vis-à-vis des antibiotiques étudiés [Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)]; (ii) comparaison de ce seuil aux valeurs critiques qui délimitent

^a Université de Bordeaux 2, UMR CNRS 5234

« Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité »,
33000 Bordeaux, France.

UMR CNRS 5234, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

* Correspondance

claudine.quentin@bacterio.u-bordeaux2.fr

article reçu le 31 décembre 2015, accepté le 31 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Automation of antibiotic susceptibility testing

Automation of antibiotic susceptibility testing has undergone considerable progress since the 1980s. Currently in France, automation of the disk diffusion method relies on automated readers of inhibition zone diameters, such as the Adagio system and the Sirscan product line. The broth microdilution method can be achieved with ready to use microplates containing serial dilutions of antibiotics (Sensititre, Microscan) and semi-automated systems include automated readers of MICs (Optiread, AutoSCAN 4). Fully automated systems that manage incubation, reading decision and MIC determination are proposed. Some of these are a direct application of the reference method, such as the Microscan WalkAway and the ARIS 2X. The Phoenix system differs slightly (colorimetric reading of the bacterial growth, around 12h of incubation). The Vitek 2 system is based on a quite different principle (MIC calculation from an algorithm applied to the growth kinetics in the absence and presence of antibiotics, 6-8h of incubation). Automated antibiotic susceptibility testing has significantly reduced the labor time and, for the rapid systems, has accelerated the response to the clinician. In addition, automation has substantially improved the results reliability through standardization of reagents and procedure, and computerization which prevents errors of categorization and transcription. (Semi)automated systems are accurate for *Staphylococcus aureus* and enterobacteria. Further improvements are needed for other non-fastidious bacteria. The diffusion method is required for the most demanding species.

Antibiotic susceptibility testing – Automation.

les catégories cliniques, et catégorisation S, I ou R ; (iii) lecture interprétative, c'est-à-dire validation biologique et thérapeutique, qui peut amener un changement de catégorisation (S à I ou R). Les concentrations critiques qui délimitent les catégories S/I/R sont établies sur la base de données pharmacocinétiques/pharmacodynamiques, microbiologiques et cliniques par des comités d'experts [1] en France le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, <http://www.sfm-microbiologie.org/>), membre du comité européen de l'antibiogramme, le « European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing » (EUCAST, <http://www.eucast.org/>).

Cette catégorisation a pour but d'anticiper l'issue d'un traitement antibiotique : un résultat « S » est prédictif d'un succès thérapeutique et un résultat « R » d'un échec. Un résultat « I » signifie que l'issue thérapeutique dépend de plusieurs variables (niveau de sensibilité et possible mécanisme de résistance de la souche, site de l'infection, modalités du traitement et caractéristiques du patient) ; c'est aussi une « zone tampon » des variations liées à la technique (incertitude de mesure). Les données de l'antibiogramme sont essentielles puisqu'elles guident le choix thérapeutique du clinicien et permettent le traitement adapté des infections documentées. De plus, collectivement, elles permettent de surveiller l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques et contribuent ainsi à définir le traitement empirique des infections non documentées.

Pour réaliser l'antibiogramme en routine, les laboratoires de bactériologie disposent d'une variété de méthodes, principalement la diffusion en gélose à l'aide de disques ou différentes versions de la microdilution en bouillon ; l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques (« Etest ») est trop onéreuse pour l'étude en routine des bactéries non exigeantes [2]. Toutes ces méthodes ont fait l'objet d'une automatisation croissante. En effet, sous la pression économique et en raison des contraintes de l'accréditation, les laboratoires de biologie médicale se sont regroupés et constituent aujourd'hui des plateaux techniques qui traitent un nombre d'actes au moins égal à celui d'un laboratoire hospitalier. L'automatisation répond aux besoins de productivité de ces groupements. De plus, elle a considérablement amélioré les performances de l'antibiogramme, essentiellement par une meilleure standardisation et la possibilité de connexions informatiques [3]. En effet, les résultats de l'antibiogramme sont influencés par de nombreux paramètres et la standardisation de la méthode accroît significativement l'exactitude et la reproductibilité des résultats, particulièrement critiques dans le cadre des nouvelles recommandations du CASFM/EUCAST, avec des zones intermédiaires réduites ou supprimées [4]. La multiplication des valeurs critiques, par genre voire par espèce, et éventuellement par site infectieux, a rendu l'informatisation de la catégorisation S/I/R indispensable. La connexion au système informatique du laboratoire (SIL) permet l'impression des résultats sans erreur de transcription, et leur stockage à des fins de suivi technique (résultats obtenus pour les souches de référence), thérapeutique (dossier bactériologique du patient) et épidémiologique (surveillance des résistances et des bactéries multi-résistantes). Les logiciels de « systèmes experts » sont une aide précieuse au contrôle des résultats, compte tenu de la multiplication des mécanismes de résistance et des règles de lecture interprétative [5]. L'attribution de codes-barres accroît la traçabilité des échantillons et des réactifs, évitant les erreurs de patients et facilitant la gestion des stocks de consommables. Cependant, la diminution de l'intervention humaine dans la réalisation, la lecture et l'interprétation de l'antibiogramme implique une surveillance accrue lors de la validation finale [3].

Le but de cette revue est de faire le point sur les modalités actuelles de l'automatisation de l'antibiogramme en France, et de discuter les avantages et les inconvénients des systèmes disponibles.

2. Antibiogramme par diffusion et automatisation

2.1. Méthode d'antibiogramme par diffusion (méthode des disques)

L'antibiogramme par diffusion en gélose consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée en nappe avec la bactérie à tester. Après incubation, la culture délimite autour des disques des zones d'inhibition circulaires dont le diamètre est inversement proportionnel à la CMI. Des droites de régression permettent d'établir pour chaque antibiotique les diamètres critiques correspondant aux concentrations critiques et d'interpréter les diamètres obtenus pour la bactérie à tester en catégories S/I/R [6].

2.2. Avantages et inconvénients de la méthode par diffusion

La longévité de la méthode des disques s'explique par de nombreux avantages, qui incluent la simplicité, un faible coût, la capacité à tester tous les antibiotiques souhaités vis-à-vis de toutes les bactéries capables de cultiver sur gélose, et la possibilité de détecter les contaminations et les interactions spécifiques, synergies ou antagonismes, évocatrices de mécanismes de résistance spécifiques [7, 8]. Dans sa version originale, cette méthode comporte cependant un certain nombre d'inconvénients que l'automatisation vise à compenser : les résultats sont seulement qualitatifs (S/I/R) et obtenus après une incubation de 18 h, et la procédure elle-même est contraignante et consommatrice de temps. En particulier la lecture, subjective, des diamètres des zones d'inhibition et leur traduction en catégories cliniques, soumise aux erreurs d'interprétation et de transcription, est une opération longue et fastidieuse [9].

2.3. Automatisation de la méthode par diffusion

2.3.1. Préparation de l'antibiogramme par diffusion

Des dispositifs turbidimétriques simples ou des spectrophotomètres plus élaborés sont disponibles depuis longtemps pour mesurer la densité des suspensions bactériennes afin de préparer un inoculum standard. Des dispositifs permettent maintenant d'obtenir la densité finale voulue sans ajustement supplémentaire (**tableau I**). Ainsi, l'Inoclic (i2a) est une tige métallique qui permet de piquer au travers d'une colonie, puis de la mettre en suspension dans un tube d'eau physiologique stérile prévu à cet effet. Après homogénéisation, la suspension a la densité 0,5 McFarland attendue. Plusieurs systèmes automatisés d'inoculation des géloses ont été récemment commercialisés [10]. Certains d'entre eux, comme le Prelud (i2a), et deux inoculateurs qui font partie de systèmes de « l'automatisation totale du laboratoire », Inocula™ (Becton-Dickinson) et Previ Isola (bioMérieux) ont été adaptés à l'inoculation de l'antibiogramme par la méthode des disques. Le système Prelud option AST permet en plus de déposer automatiquement les disques, stockés dans des conteneurs réfrigérés avec un contrôle de l'humidité.

Tableau I – Automatisation de l'antibiogramme par diffusion.

Automatisation	Sirscan (i2a)	Autre (Fabricant)
Préparation de l'inoculum	Inoclic	-
Inoculation des boîtes	Prelud (Option AST : + dépôt des disques)	Inoqul A (Becton-Dickinson) Previ Isola (BioMérieux)
Lecture de l'antibiogramme	SirSCAN micro SirSCAN 2000 SirSCAN 2000 automatic	Adagio (Bio-Rad)
Logiciel de gestion des données Système expert	+	Adagio (Bio-Rad)

2.3.2. Lecture de l'antibiogramme par diffusion

Les premières tentatives de lecteurs automatiques de l'antibiogramme par diffusion datent des années 1970. Plusieurs systèmes ont été commercialisés dans les années 1990-2000, comme le Biomic, le Sirscan, l'Aura Image, l'Osiris et le Mastascan Elite [11]. Tous comprennent une caméra ou un scanner qui capture l'image de l'antibiogramme et un logiciel qui analyse cette image et en tire les diamètres des zones d'inhibition. L'opérateur place l'antibiogramme dans le tiroir du lecteur. Après numérisation de l'image, l'antibiogramme apparaît sur l'écran de l'ordinateur avec la mesure des diamètres. A ce stade, les zones d'inhibition peuvent être ajustées par l'opérateur si nécessaire. Puis le logiciel d'analyse des données détermine la catégorie S/I/R [8, 11].

Les systèmes actuellement disponibles en France incluent la gamme Sirscan (i2a) et l'Adagio qui a remplacé l'Osiris (Bio-Rad). Ces systèmes assurent la lecture, l'interprétation et le contrôle des résultats grâce à un système expert et, *via* le SIL, la transmission et l'impression des résultats. L'Adagio est un lecteur, plus automatisé et équipé d'un analyseur d'image plus puissant que l'Osiris. Le Sirscan, quant à lui, offre une gamme de produits permettant l'automatisation de toutes les étapes de l'antibiogramme par diffusion. Ainsi, l'inoculum peut être préparé avec l'Inoclic, l'inoculation et le dépôt des disques avec le Prelud. Le lecteur d'antibiogramme existe sous 3 versions : le SirSCAN micro, lecteur d'antibiogramme compact ; le SirSCAN 2000, lecteur automatisé qui dispose d'une imagerie à haute performance, d'une banque d'images, du système expert intégré SirWeb, et d'une gestion des boîtes par code-barres ; le SirSCAN 2000 automatic est un système intégré qui comprend en plus le chargeur/incubateur/lecteur automatisé qui déclenche la lecture à la fin du temps d'incubation et transmet les résultats au SIL. Un milieu « rapide », le MH SIR, permet d'obtenir des résultats en 5 à 8 heures pour la plupart des bactéries à croissance rapide. Avec ce milieu, le SirSCAN 2000 automatic effectue une lecture en continu avec ré-incubation jusqu'à ce que le résultat final soit disponible. La transmission au SIL peut être automatique ou déclenchée par l'utilisateur. Les lecteurs Adagio et Sirscan varient suivant le format des boîtes acceptées et la reconnaissance plus ou moins automatisée des disques d'antibiotiques, du même fabricant ou de toutes origines. Les deux systèmes disposent d'un module de lecture des E-tests. La lecture de la CMI est facilitée par la qualité de l'image et la possibilité de zoomer. Avec l'Adagio, la présence du Etest est automatiquement détectée, un curseur peut être ajusté à la valeur

de la CMI et l'image peut être orientée. Très récemment, le système Advencis Bio-System (bioMérieux) est apparu sur le marché [12]. Cet appareil comprend un imageur vidéo à haute résolution qui capte en temps réel les images des boîtes de Petri placées dans un incubateur dédié, ainsi qu'un logiciel spécifique pour analyser ces images. Les premiers résultats sont obtenus très rapidement en raison de la très haute qualité de l'imagerie numérique. Ainsi, avec les entérobactéries, les zones d'inhibition sont lisibles en 3 à 4 h, permettant de détecter précocement des résistances d'importance clinique [β -lactamase à spectre élargi (BLSE), résistances aux carbapénèmes]. Cependant, les zones d'inhibition se stabilisent plus tard, et peuvent être significativement diminuées à 24 h, conduisant éventuellement à des changements de catégorie. De plus, le système actuel a une faible capacité (6 boîtes de Pétri) [12].

2.4. Avantages et limites de l'automatisation de l'antibiogramme par diffusion

2.4.1. Préparation de l'antibiogramme par diffusion

Très peu d'études ont évalué les systèmes de préparation de l'antibiogramme par diffusion. Très récemment, Hombach et al [13] ont rapporté que l'ajustement visuel de l'inoculum avec une gamme Mac Farland donnait une densité plus proche de la valeur recommandée que celle obtenue à l'aide d'un photomètre (Densichek, bioMérieux). Une autre étude [14] a montré que l'ensemencement automatique InoqulA™ réduisait les variations inter-opérateurs. La courbe de concordance entre les diamètres des zones d'inhibition obtenus par inoculation manuelle ou en utilisant le Previ Isola avait un coefficient de corrélation de 0,974 ; la catégorisation S/I/R avait une sensibilité de 99 % et une spécificité de 100 %. Le temps nécessaire à l'inoculation était de 51 s par gélose au lieu de 1 min 40 manuellement, et le résultat était reproductible.

2.4.2. Lecture de l'antibiogramme par diffusion

Les lecteurs automatiques de l'antibiogramme par diffusion réduisent considérablement le temps de travail manuel. Cependant, l'ajustement des zones d'inhibition allonge le temps de lecture. Le système de codes-barres supprime le temps passé à renseigner les coordonnées du patient, du prélèvement et de la souche [15].

Ces lecteurs automatiques améliorent significativement la précision et la reproductibilité des résultats [15]. En effet, ils permettent de standardiser les conditions de lecture des zones d'inhibition : lumière, positionnement de la boîte et fond d'image. Les cercles qui définissent les zones d'inhibition

floues sont tracés à ~80 % d'inhibition de croissance. L'analyseur d'image prend en compte les zones d'inhibition chevauchantes et les zones non circulaires telles que celles qui résultent de synergies ou d'antagonismes, ou celles qui sont tronquées par les bords ou les angles des boîtes de Petri, alors que dans ces cas, la lecture manuelle se fait en mesurant le rayon et en le multipliant par 2 pour obtenir un diamètre. De plus, ces systèmes éliminent la subjectivité de la lecture des antibiogrammes par diffusion, en supprimant la variabilité liée à l'opérateur. Enfin, l'automatisation de la lecture des antibiogrammes par diffusion permet son informatisation, avec tous les avantages indiqués précédemment.

Les lecteurs automatiques d'antibiogrammes fournissent des résultats non seulement qualitatifs (S/I/R) mais aussi quantitatifs (diamètres). L'exactitude des systèmes commercialisés dans les années 2000, dont le Sirscan et l'Osiris [16], a été confirmée dans plusieurs études. La corrélation entre la lecture automatisée et la lecture manuelle est excellente pour les bactéries à croissance rapide sur milieux transparents [8, 11]. L'«essential agreement» (EA, différence entre les 2 mesures ≤ 3 mm) atteint habituellement plus de 90 % [16]. Néanmoins, les valeurs de l'EA varient suivant la bactérie [meilleures pour les Entérobactéries que pour les staphylocoques, et pour les staphylocoques que pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-NF) ou les entérocoques] et l'antibiotique (EA médiocres pour le cotrimoxazole) [15, 16]. Ces bons EA sont associés à des «categorical agreement» (CA, concordance entre les catégories S/I/R déterminées automatiquement et manuellement) élevés. La fréquence des «very major errors» (VME, catégorie R par la mesure manuelle et S par la mesure automatique), des «major errors» (ME, l'inverse) et des «minor errors» (erreurs impliquant une catégorisation I) est habituellement inférieure à 1,5 % [15, 16]. La plupart de ces erreurs sont observées pour les couples bactéries-antibiotiques qui donnent des zones d'inhibition dont les diamètres sont proches des diamètres critiques [15]. Comme attendu, la reproductibilité est meilleure pour les mesures automatiques que pour les mesures manuelles [15]. Les lecteurs automatiques d'antibiogramme peuvent être utilisés avec des géloses opaques comme les géloses au sang, mais ils sont moins performants [11]. Ces systèmes estiment les CMI d'après les diamètres des zones d'inhibition. Cependant, les droites de régression CMI-diamètres varient suivant le genre voire l'espèce bactérienne [6, 9], la concordance n'est pas linéaire pour les valeurs extrêmes et la validité de l'extrapolation des CMI à partir des diamètres a été mise en question pour certains couples bactéries-antibiotiques [8].

Malgré les progrès de l'imagerie, un contrôle visuel des boîtes par un microbiologiste expérimenté avant et pendant la lecture automatique de l'antibiogramme est nécessaire [8]. Une attention particulière doit être portée aux discordances les plus fréquentes entre la lecture visuelle et la lecture automatique. Les bactéries qui donnent une croissance faible (ex : entérocoques) sont la source la plus fréquente des discordances. Les lecteurs automatiques ont souvent du mal à détecter la faible croissance au niveau de la bordure de la zone d'inhibition de certains disques, notamment le cotrimoxazole, qui tend en plus à donner des

microcolonies dans la zone d'inhibition. Une croissance non confluyente et des zones de diffusion colorées, par des pigments d'origine bactérienne (ex : *Pseudomonas aeruginosa*) ou antibiotique (ex : nitrofuranes), sont également des causes d'erreur [8, 15, 16]. Une dérive possible de la caméra doit être surveillée par un contrôle régulier avec des souches de référence.

Actuellement, la méthode des disques est toujours largement utilisée, y compris dans les laboratoires de bactériologie équipés d'automates à antibiogramme, parce qu'elle est nécessaire pour les bactéries exigeantes. De plus, cette méthode permet de vérifier visuellement des résultats inattendus ou ambigus fournis par les automates, en particulier les mélanges ou les mécanismes de résistance associés à des images évocatrices (ex : BLSE). Les lecteurs automatiques d'antibiogrammes par diffusion ont rendu cette méthode plus populaire. Ils représentent une alternative aux automates à antibiogramme, peu coûteuse et efficace pour les plus petits laboratoires et les pays en développement.

3. Antibiogramme par dilution en bouillon et automatisation

3.1. Méthodes d'antibiogramme par dilution en bouillon

Les systèmes semi-automatisés ou automatisés de détermination de la sensibilité aux antibiotiques par dilution en bouillon peuvent être divisés en trois groupes selon leur principe : les systèmes qui incluent une gamme de concentrations, ceux qui testent uniquement les concentrations critiques, et les systèmes «rapides» basés sur des concentrations d'épreuve. Dans chaque groupe, un développement continu a conduit à une automatisation croissante, de la simple mécanisation des méthodes traditionnelles à des systèmes entièrement automatisés.

3.1.1. Systèmes utilisant une gamme de concentrations

3.1.1.1. Microplaques commercialisées

Des plaques de microdilution incluant plusieurs antibiotiques à différentes concentrations peuvent être préparées au laboratoire, mais la procédure est contraignante. C'est pourquoi des microplaques prêtes à l'emploi ont été commercialisées dès les années 1970 [8]. Ces microplaques contiennent des dilutions d'antibiotiques de raison géométrique 2, sous forme congelée (ex : MicroMedia Systems, PASCO) ou déshydratée (ex : Sensititre, Sceptor, API-ATB) ou sous les 2 formes (MicroScan); l'addition d'un indicateur coloré d'oxydo-réduction peut faciliter la lecture (ex : Alamar Blue). Les microplaques qui contiennent les antibiotiques sous forme déshydratée sont plus faciles à stocker (température ambiante) et ont une plus longue durée de vie (en moyenne 12-18 mois) que les microplaques contenant des antibiotiques sous forme congelée.

Actuellement, des microplaques standards de 96 puits (12 x 8) MicroScan (Beckman Coulter) et Sensititre (ThermoFisher Diagnostics) contenant des antibiotiques

Tableau II – Automatisation de l'antibiogramme par microdilution en bouillon – Systèmes semi-automatisés.

Automatisation	Sensititre (ThermoScientific)	Microscan (Beckman Coulter)
Microplaques	96 puits (12 x 8)	96 puits (12 x 8)
Préparation de l'inoculum	Néphélomètre	Prompt
Distribution de l'inoculum	Pipette multi-canaux électronique Auto-inoculateur AIM	Renok
Lecture visuelle	Vizion	-
Lecture automatique	Optiread	Autoscan-4
Logiciel de gestion des données	SWIN	LabPro/HighFlexX
Système expert	Système Expert	LabPro Alert

déshydratés, avec un dispositif mécanique de réhydratation et/ou d'inoculation sont commercialisées en France [8] (*tableau II*). Des microplaques peuvent également être préparées à la demande (Sensititre). Des dispositifs permettent d'ajuster l'inoculum, comme le Néphélomètre de Sensititre. Le Prompt de MicroScan est une pointe calibrée qui permet, après mise en suspension dans un flacon prêt à l'emploi, de préparer un inoculum standard stable pendant 4 h sans ajustement de turbidité. Des distributeurs de milieu et/ou d'inoculum sont disponibles. Ils peuvent être manuels comme la pipette multicanaux électronique de Sensititre ou le Renok de MicroScan, ou automatiques comme l'inoculateur AIM de Sensititre ou le MicroScan SH2000 de Beckman Coulter. L'AIM comme le SH2000 évitent les puits « sautés » observés avec les pipettes multicanaux classiques. Après incubation dans une étuve standard, les CMI sont déterminées à l'aide d'un dispositif manuel (miroir) ou semi-automatisé comme le Vizion de Sensititre couplé à un ordinateur équipé du logiciel SWIN. Ce système affiche sur un écran une image agrandie de la microplaque recouverte par un modèle permettant d'indiquer manuellement les puits correspondant aux CMI. Il peut avoir une interface avec le SIL. Le logiciel SWIN est équipé d'un système expert permettant d'appliquer les critères de catégorisation. Il permet également d'imprimer les comptes rendus d'analyse et de stocker les données pour une exploitation ultérieure.

Il faut noter qu'à côté des microplaques, des bandelettes contenant des dilutions sériées d'un seul antibiotique ont été commercialisées (ex : bandelettes *Just One*). Ce type de produit pourrait être amené à se développer, compte tenu des résultats non fiables observés avec la méthode des disques et même avec les Etests pour certains antibiotiques d'intérêt comme la colistine.

3.1.1.2. Microplaques et systèmes semi-automatisés

Les systèmes semi-automatisés utilisent des dispositifs automatiques de lecture photométrique ou fluorométrique de la croissance bactérienne après incubation dans une étuve standard. L'addition de substrats fluorogéniques permet en principe une détection plus sensible de la croissance bactérienne et donc une lecture plus rapide des microplaques. Cependant, la lecture fluorométrique rapide est aujourd'hui réservée aux tests d'identification et les microplaques ou les puits destinés à la détermination des CMI sont lus après une incubation de 16-18 h. Ces systèmes automatisent seulement l'étape finale de lecture de la CMI [8]. Les résultats sont transférés au

système de gestion des données. Ce logiciel peut être connecté au système expert associé aux appareils entièrement automatisés de la gamme du produit considéré. Le miniAPI capable de lire les galeries Rapid ATB a été l'un de ces systèmes. Les appareils de ce type actuellement commercialisés sont le Sensititre Optiread et le MicroScan Autoscan 4.

3.1.1.3. Microplaques et systèmes entièrement automatisés

Dans une ultime étape d'automatisation, des modules d'incubation-lecture ont été intégrés aux systèmes précédents. Ces modules incluent un carrousel qui positionne automatiquement les microplaques sous le photomètre ou le fluoromètre central qui effectue la lecture. Ils comprennent également un scanner de codes-barres. Ces appareils ne nécessitent plus aucune intervention manuelle pour obtenir les résultats après la mise en place de la microplaque dans l'incubateur-lecteur [8]. Ils sont aujourd'hui représentés par le MicroScan WalkAway (Becton Dickinson) et l'Aris 2X (ThermoFisher Scientific) (*tableau III*).

Le MicroScan WalkAway a été développé à la fin des années 1980. La dernière version WalkAway plus va être lancée en 2016. Deux formats d'appareils accueillent 40 ou 96 microplaques. Les panels actuellement disponibles incluent des panels « CMI », des panels « Combo » (certains puits utilisés pour l'identification) et des panels « breakpoint » (concentrations critiques). L'inoculum est préparé à l'aide du Prompt et distribué à l'aide du RENOK ou du SH2000. Depuis 2002, le système de gestion des données LabPro a été couplé au système expert LabPro Alert. Le logiciel HighFlexX est une solution Middleware introduite en 2013. Le Sensititre ARIS a été commercialisé aux États-Unis en 1992. La dernière version, ARIS 2X, qui dispose d'un ordinateur et d'un logiciel plus élaborés, a été mise sur le marché en 2004. L'ARIS 2X peut contenir jusqu'à 64 microplaques. Il existe des panels « CMI », « breakpoint » et « identification ». Les microplaques sont réhydratées et inoculées avec la pipette multicanaux électronique ou l'inoculateur AIM, avant leur mise en place dans le carrousel de l'incubateur-lecteur. Le lecteur de codes-barres assigne à chaque microplaque un temps d'incubation et, lorsque ce temps est atteint (16-18 h), la microplaque est transférée au lecteur OptiRead. Le logiciel de gestion des données Swin analyse les résultats à l'aide du système expert et le logiciel Swin Epidemiology génère des rapports en temps réel. Ainsi, Sensititre et MicroScan proposent une gamme de dispositifs et d'appareils, allant de simples microplaques inoculées et lues manuellement ou

Tableau III – Automatisation de l'antibiogramme par microdilution en bouillon – Systèmes automatisés.

Paramètre	Microscan (Beckman Coulter)	Aris 2X (ThermoFisher)	Phoenix (Becton Dickinson)	Vitek 2 (BioMérieux)
Préparation de l'inoculum	Prompt, Renok, SH2000	Pipette multicanaux électronique, Auto-inoculateur AIM	Phoenix AP	-
Modèles (capacité)	Microscan WalkAway (40 ou 96 microplaques)	Aris 2X (64 microplaques)	BD Phoenix (100 galeries)	Vitek 2 (60 cartes) Vitek 2 XL (120 cartes) Compact (30 ou 60 cartes)
Panels	CMI + ID ou CMI ou cC* Microplaques à 96 puits CMI : gammes de concentrations d'antibiotiques de raison 2	CMI ou ID ou cC* Microplaques à 96 puits CMI : gammes de concentrations d'antibiotiques de raison 2	CMI + ID ou CMI Galeries à 2 rangées, 136 puits CMI : gammes de concentrations de raison 2 centrées sur les cC	CMI ou ID Cartes à 64 puits CMI : 1-6 concentrations testées à couverture des cC
Principe de la détermination de la CMI	Lecture directe basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne	Lecture directe basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne	Lecture indirecte basée sur une modification de couleur liée à l'inhibition de la croissance bactérienne	Calcul grâce à un algorithme basé sur la vitesse de croissance en l'absence d'antibiotique et en présence de concentrations d'épreuve
Lecture : méthode rythme de lecture	Turbidimétrie En point final	Turbidimétrie En point final	Colorimétrie (indicateur red-ox) Toutes les 20 minutes	Néphélométrie Toutes les 15 minutes
Temps moyen d'antibiogramme	16-18 heures	16-18 heures	12 heures	6-8 heures
Système Expert	LabPro Alert Validation thérapeutique	SWIN Validation thérapeutique	BDXpert Validation thérapeutique	Advanced expert System (AES) Validation biologique et thérapeutique

cC : concentrations critiques basses et hautes ; * non commercialisé actuellement en France ; ID : identification

automatiquement, à des systèmes partiellement ou entièrement automatisés. Cependant, le MicroScan WalkAway et l'ARIS 2X demandent une nuit d'incubation pour la lecture de l'antibiogramme.

Le Phoenix (Becton-Dickinson) est un système qui se rapproche des précédents, mais qui s'en distingue par des microplaques différentes, l'utilisation d'un indicateur coloré d'oxydo-réduction pour détecter la croissance bactérienne, donnant des résultats plus rapides. Cet appareil est disponible en Europe depuis 2001 et aux États-Unis depuis 2004. Il peut contenir jusqu'à 100 microplaques. Ces microplaques sont des galeries de polystyrène comprenant 136 puits, soit entièrement dédiés à l'antibiogramme, soit répartis en 51 puits d'identification d'un côté et 85 puits permettant de tester 14 à 22 antibiotiques de l'autre. Le Phoenix AP a été introduit en 2008 pour standardiser l'inoculum et ajouter l'indicateur d'oxydo-réduction au bouillon AST de façon entièrement automatique. Puis les bouillons inoculés pour identification et/ou antibiogramme sont versés du côté approprié de la galerie. Celle-ci est obturée et placée dans l'incubateur-lecteur. Le Phoenix lit les microplaques toutes les 20 minutes en utilisant à la fois le changement colorimétrique de l'indicateur d'oxydo-réduction et la turbidité pour déterminer la croissance bactérienne. L'ensemble des résultats est obtenu en 6 h à 16 h. Ces résultats sont transférés au logiciel de gestion des données BD EpiCenter, et analysés par le système expert BDXpert [8].

3.1.2. Systèmes basés sur les concentrations critiques

Les systèmes basés sur les concentrations critiques permettent de tester un plus grand nombre d'antibiotiques par microplaque que les systèmes utilisant des gammes

de concentrations, et ils sont de lecture plus facile : une croissance aux deux concentrations correspond à une résistance, une croissance à la seule concentration la plus faible traduit une sensibilité intermédiaire, et l'absence de croissance aux deux concentrations témoigne d'une sensibilité. Leur inconvénient principal est l'impossibilité de contrôler correctement leur validité : des pertes d'activité plus ou moins faibles des antibiotiques passent inaperçues avec les souches de référence, généralement très sensibles. Les galeries API-ATB étaient basées sur ce principe. Les panels « breakpoint » des gammes Sensititre et MicroScan sont la version actuelle de ces systèmes, mais ils ne sont pas commercialisés en France à ce jour.

3.1.3. Systèmes « rapides » basés sur des concentrations d'épreuve

Depuis les années 1970, des appareils capables de fournir des résultats d'antibiogramme en 3 à 5 h ont été développés. Pour atteindre cet objectif, une variété de stratégies a été utilisée, le seul impératif étant de fournir des résultats comparables à ceux obtenus avec les méthodes de référence dans un temps beaucoup plus court. Ainsi, des milieux de culture permettant une croissance plus rapide et un inoculum plus dense que dans les conditions standards ont été utilisés. Surtout, les concentrations réelles d'antibiotiques dans les puits ont été manipulées afin d'obtenir le résultat escompté. Avec ces appareils, la CMI n'est pas lue mais calculée grâce à un algorithme, par comparaison de la croissance en l'absence d'antibiotique (témoin) et en présence d'une concentration test de chaque antibiotique [17]. L'Autobac, le MS-2 et le Cobast-Bact ont fait partie des premiers appareils de ce type. La concordance globale avec les méthodes de référence lors d'une utilisation en

routine dépassait 90 %, mais de graves discordances sont rapidement devenues évidentes pour plusieurs couples bactérie-antibiotique en particulier en cas de résistances qui demandent du temps pour s'exprimer (ex : méthicillino-résistance des staphylocoques, résistance aux β -lactamines dues aux β -lactamases chromosomiques inductibles des entérobactéries) (17), et ces instruments ont été abandonnés. Le seul représentant actuel de ce type d'appareil est le Vitek 2 (bioMérieux) qui est une version moderne de l'Automicrobic, un automate conçu dans les années 1970 pour être utilisé dans les navettes spatiales américaines et, de ce fait, hautement automatisé et très compact. Ainsi, les microplaques ont été remplacées par de très petites cartes en plastique contenant des antibiotiques sous forme déshydratée. Le Vitek a été introduit en Microbiologie clinique dans les années 1980. Le Vitek 2, plus automatisé, est disponible depuis 2000 aux États-Unis et en Europe. Cet appareil a une capacité de 60 cartes, et la version Vitek 2 XL de 120 cartes ; le Vitek 2 Compact, introduit en 2005 pour les petits laboratoires, est une version moins automatisée et plus abordable permettant de traiter 15, 30 ou 60 cartes. Les cartes comprennent 64 micro-puits dédiés soit à l'identification soit à l'antibiogramme, mais une carte d'identification de Gram positif ou de Gram négatif non exigeant peut être analysée en même temps que la carte d'antibiogramme correspondante. Un nombre limité de concentrations d'antibiotiques (1 à 6 concentrations d'épreuve de 9 à 20 antibiotiques) est utilisé pour couvrir les concentrations d'intérêt thérapeutique. L'appareil est équipé d'une « Smart Carrier Station » qui comprend une unité de base avec microprocesseur contenant une cassette d'une capacité de 15 cartes et un lecteur de codes-barres. L'inoculum est préparé manuellement. Aucun réactif n'est à ajouter. Les cartes sont placées dans la cassette, des puces électroniques permettant le transfert de l'information numérisée à l'incubateur-lecteur. Après que la cassette ait été placée dans le poste de chargement du Vitek 2, elle est automatiquement déplacée au travers des postes de lecture des codes-barres, de dilution de l'inoculum, d'inoculation puis de fermeture de la carte. Le système de transport place alors les cartes sur un carrousel pour l'incubation. Chaque carte est déplacée vers le poste de lecture toutes les 15 minutes pour une mesure de la transmission de la lumière, proportionnelle à la croissance. Une analyse par régression linéaire calcule les CMI à l'aide d'un algorithme et les résultats sont disponibles en 4 à 16 h. Le système de gestion des données actuel du Vitek 2, l'Observa, est basé sur Windows, et offre une présentation plus explicite du système expert (AES) initialement proposé avec le Vitek 2. Il permet d'établir des rapports variés sur le fonctionnement et les résultats de l'appareil [8]. Le Vitek 2 est le système le plus automatisé.

3.2. Avantages et limites des méthodes d'antibiogramme par dilution en bouillon

Les avantages des méthodes par dilution en bouillon comprennent, outre une diminution du temps de travail manuel et des résultats rapides pour les systèmes les plus automatisés, la production de données quantitatives (CMI) [3, 8].

Le temps de travail manuel est particulièrement réduit avec les systèmes entièrement automatisés. Une étude [18] a montré qu'avec le Vitek 2 le temps moyen de préparation des panels était plus court mais le temps de maintenance mensuel plus long qu'avec le Phoenix (63,2 *versus* 21,2 min). Cependant l'introduction du Phoenix AP a réduit le temps de manipulation pour le Phoenix de 50 % (19). Par ailleurs, l'automatisation augmente la sécurité pour le personnel en diminuant les contacts avec les échantillons, en particulier avec le Vitek 2.

L'obtention des résultats est plus rapide avec le Vitek 2 (8,4 $\pm$ 2 h) qu'avec le Phoenix (12,1 $\pm$ 2,7 h) [18], et le MicroScan WalkAway ou l'ARIS 2X et les systèmes moins automatisés des gammes correspondantes. Un résultat rapide contribue à un meilleur flux de travail [8, 18, 19]. De plus, un résultat d'antibiogramme un jour plus tôt qu'avec les méthodes conventionnelles est censé améliorer les soins au patient. En fait, toutes les études sur l'impact clinique et économique des résultats rapides ont montré qu'effectivement ils permettent aux médecins d'entreprendre ou de passer plus vite à une antibiothérapie adaptée [20-22] avec pour résultat des économies substantielles liées à la réduction de la durée et du coût de l'hospitalisation [22]. Cependant, une amélioration de l'évolution clinique n'a été démontrée que dans deux études [21, 22] et une diminution de la mortalité dans une seule [21]. De plus, les avantages d'un résultat d'antibiogramme rapide impliquent une vérification en temps réel par un microbiologiste responsable et une transmission immédiate au clinicien [8]. Enfin, des résultats rapides et rapidement contrôlés et transmis ne sont pas toujours instantanément utilisés par les praticiens [20].

Les indications de la détermination des CMI sont limitées. Les indications cliniques comprennent essentiellement l'endocardite et l'ostéomyélite, au cours desquelles les CMI peuvent aider le médecin à choisir un antibiotique parmi des molécules similaires pour un traitement prolongé [23]. Les indications microbiologiques comprennent les quelques antibiotiques pour lesquels la détermination de la CMI par dilution en bouillon est obligatoire parce qu'ils diffusent mal en gélose (ex : colistine) [23]. Elles comprennent également les bactéries pour lesquelles une sensibilité diminuée influence le choix de l'antibiotique et les posologies (ex : pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline) et les espèces pour lesquelles le test par diffusion n'est pas encore calibré (ex : *Neisseria* spp. pour le CASFM/EUCAST) ou pour lesquelles il n'existe pas encore de normes spécifiques (ex : *Bacillus* spp.). Cependant, les CMI prises en compte pour une adaptation fine des posologies aux données pharmacocinétiques/pharmacodynamiques [24] doivent être déterminées par la méthode de référence ou, à défaut, par Etests si cette méthode a été validée pour l'antibiotique considéré.

Les inconvénients des systèmes plus ou moins automatisés d'antibiogramme incluent un coût plus élevé pour les appareils et les consommables qu'avec la méthode par diffusion, l'absence de flexibilité dans le choix des antibiotiques et des bactéries à tester et l'impossibilité

de visualiser la pureté de l'inoculum et les interactions antibiotiques évocatrices de mécanismes de résistance particuliers [2, 3, 23].

L'absence de flexibilité dans le choix des antibiotiques est un inconvénient relatif et peut même être vue comme un avantage. En effet, tous les fabricants proposent une variété satisfaisante de panels, en moyenne 8 à 9, chacun d'une vingtaine d'antibiotiques. Ces panels, restreints ou étendus, sont adaptés aux Gram positif (staphylocoques, streptocoques/entérocoques ou pneumocoque) et aux Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*/BGN-NF) ainsi qu'aux urines. Sensititre-ThermoFisher propose des panels plus variés : panels standards « Campylobacter », « Anaérobies » (norme non CE), et panels pour les bactéries exigeantes (*Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. et *Mycobacterium* spp.). Des panels vétérinaires (Sensititre, Vitek 2) sont aujourd'hui disponibles. Les antibiotiques testés sont pertinents car sélectionnés sur la base des recommandations des comités d'experts nationaux (CASFM/EUCAST en France). Ils évitent aux Biologistes un choix aléatoire. Le panel Sensititre MycoTB récemment commercialisé devrait révolutionner l'antibiogramme des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. En effet, cette microplaque permet de déterminer la CMI des antituberculeux de première et de deuxième ligne, une semaine plus tôt qu'avec la méthode de référence des proportions et sans équipement particulier [25].

Par contre, la difficulté, voire l'impossibilité de tester toutes les bactéries d'intérêt clinique capables de cultiver dans des conditions standards est une vraie limitation des méthodes par dilution en bouillon. En effet, les bactéries exigeantes poussent irrégulièrement dans les systèmes de dilution en bouillon et l'ajout de suppléments peut troubler le milieu. Quand elles poussent, leur faible croissance influence la valeur des CMI. Les évaluations des systèmes semi-automatisés pour les bactéries exigeantes sont rares et anciennes et la corrélation avec les méthodes de référence est souvent < 90 % [26]. Environ 20 à 40 % des anaérobies ne poussent pas dans ces dispositifs. Les microplaques les plus récentes ont des performances variables [27]. Cette limitation oblige les laboratoires à disposer de méthodes additionnelles de détermination de la CMI, méthode des disques et/ou Etests.

En ce qui concerne la pureté de l'inoculum, tous les fabricants des systèmes (semi)automatisés d'antibiogramme par dilution en bouillon recommandent de faire une « gélose de pureté » c'est-à-dire un isolement de l'inoculum utilisé, pour vérifier l'absence de contamination. Cependant ce contrôle, consommateur de temps de travail et de réactifs et qui ne donne des résultats qu'après 18 h d'incubation, n'est pas toujours effectué. Même lorsqu'il est réalisé, il ne permet pas de distinguer 2 souches de même espèce présentant un profil de résistance aux antibiotiques différent, ou de détecter une souche hétérogène quant à sa sensibilité aux antibiotiques. Si l'inoculum utilisé s'avère être un mélange, l'examen doit être entièrement recommencé, augmentant le coût et retardant encore les résultats.

L'absence de visualisation des interactions antibiotiques a été en partie compensée par l'introduction de tests spécifiques dans les panels, comme les tests d'induction de la résistance à la clindamycine chez les staphylocoques-streptocoques et les tests de détection des BLSE chez les entérobactéries, avec des succès variables.

4. Fiabilité des résultats

4.1. Considérations générales

Quel que soit le système utilisé, la fiabilité des résultats des antibiogrammes automatisés est, en quelque sorte, garantie par la loi. En effet, les dispositifs permettant d'automatiser l'antibiogramme ne peuvent être commercialisés en Europe que s'ils satisfont à la norme ISO 20776-2:2007 établie par l'« International Organization for Standardization » (Genève, Suisse). Cet organisme a développé une méthode de référence de détermination de la CMI par microdilution en bouillon proche de celle préconisée aux États-Unis et a adopté des critères de performances acceptables voisins. Chaque nouveau système doit faire l'objet d'études multicentriques montrant qu'il est au moins équivalent aux systèmes préexistants. Le niveau de performance exigé pour chaque couple bactérie-antibiotique est un EA (CMI identique à celle déterminée par la méthode de référence ± 1 dilution) et un CA (même catégorisation S/I/R que la méthode de référence) ≥ 90 %, avec ≤ 3 % de « very major discrepancies » (VMD : nombre de souches faussement sensibles/nombre de souches résistantes testées x 100) ou de « major discrepancies » (MD : nombre de souches faussement résistantes/nombre de souches sensibles testées x 100) et ≤ 7 % de MD et de « minor discrepancies » (discordances impliquant la catégorie I/nombre total de souches x 100). Toute combinaison bactérie-antibiotique ne répondant pas à ces normes doit être signalée par le fabricant comme une limitation de son système avec la recommandation d'utiliser une autre méthode. Des limitations additionnelles doivent figurer dans les caractéristiques du système si l'évaluation n'a pas inclus un nombre significatif de bactéries résistantes, a montré une reproductibilité insuffisante (< 95 %) ou un nombre trop élevé d'absence de croissance pour un groupe bactérien donné (> 10 %). Il est important de consulter attentivement les documents fournis par les fabricants d'automates pour bien connaître les limitations de leurs appareils. Les critères définissant les catégories S/I/R doivent être ceux recommandés par le comité d'experts national. Si ces critères changent, les fabricants doivent réaliser une nouvelle étude comparative et, si les performances de l'appareil sont affectées par les nouvelles valeurs critiques, une nouvelle validation doit être effectuée [8].

4.2 - Variations suivant les systèmes (tableau III)

Les gammes Sensititre et MicroScan proposent des produits directement adaptés de la méthode de détermination de la CMI par microdilution en bouillon, aujourd'hui considérée comme la référence. Ils ont donc de grandes chances de donner des résultats concordants avec les valeurs attendues. Dès les premiers essais des microplaques prêtes à l'emploi, il s'est avéré qu'elles étaient plus

reproductibles que les microplaques « maison », démontrant l'intérêt de la standardisation. L'utilisation de substrats fluorogéniques avait pour objectif de rendre la lecture de l'antibiogramme plus rapide, mais les résultats n'ont pas été concluants. Par contre, la concordance entre les CMI déterminées visuellement et automatiquement après 18 h d'incubation était excellente. Aujourd'hui, ces systèmes déterminent la CMI par une lecture directe, visuelle ou photométrique, de la croissance bactérienne, après une incubation standard de 16-18 h.

Le Phoenix s'éloigne davantage de la méthode de référence. Il détermine la CMI par une lecture indirecte, colorimétrique, de la croissance bactérienne, après une incubation plus courte que l'incubation standard. Néanmoins le Phoenix, comme les systèmes Sensititre et MicroScan, détermine la CMI directement par lecture de la croissance ou de l'absence de croissance dans les puits de microplaques contenant des dilutions sériées d'antibiotiques. Par ailleurs, la banque de données des systèmes experts de ces automates est avant tout constituée par les règles d'interprétation des comités d'experts nationaux qui sont rigoureusement appliquées (sauf « customisation » par le biologiste, ce qui demande une certaine expertise...). Des données additionnelles permettent d'identifier des phénotypes de résistance plus ou moins exactement.

Contrairement aux systèmes précédents, le Vitek 2 ne détermine pas directement la CMI par une lecture de la croissance bactérienne, mais les calcule grâce à un algorithme basé sur la vitesse de croissance en l'absence d'antibiotique et en présence de concentrations d'épreuve, après une incubation très courte. Ce système est donc particulièrement sensible aux différents paramètres de la détermination de la CMI, notamment la densité de l'inoculum. Les cartes de l'appareil ne permettent pas un contrôle visuel de la croissance bactérienne, contrairement aux microplaques des autres systèmes. Les changements de concentrations critiques demandent une mise au point complexe, et sont souvent mis en place avec retard. Enfin, le système expert du Vitek 2 est très différent de celui des automates précédents. La banque de données est une compilation de dizaines de milliers de CMI de multiples antibiotiques pour des espèces variées présentant des mécanismes de résistance divers, issues de différentes sources. Le système expert effectue d'abord une validation biologique (cohérence des CMI obtenues avec le phénotype identifié par le système pour l'espèce considérée), à la suite de quoi il peut proposer des modifications d'interprétation voire de CMI, s'il y a un petit nombre de discordances, ou de re-tester la souche si le nombre de discordances est élevé par rapport au phénotype attendu. Puis il effectue une validation thérapeutique comme les autres systèmes experts. Un ou plusieurs phénotypes peuvent être proposés, impliquant des tests complémentaires pour lever toute ambiguïté, ce qui est consommateur de temps de travail et de réactifs et retarde les résultats.

4.3. Variations suivant les bactéries

Globalement, les automates à antibiogramme sont fiables pour *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries, mais pas pour *Pseudomonas aeruginosa* et les *Acinetobacter* spp. [3]. La performance des systèmes experts devrait être

sensiblement améliorée pour les staphylocoques à coagulase négative et les entérocoques par une identification au stade de l'espèce plus exacte, grâce à la spectrométrie de masse. Cependant, la détection de certains mécanismes de résistance reste problématique pour toutes les méthodes d'antibiogramme. Il s'agit principalement de résistances à bas niveau, qui donnent des CMI proches de celles des souches sauvages et des concentrations critiques (méthicillino-résistance très hétérogène des staphylocoques, sensibilité diminuée aux glycopeptides, linézolide et daptomycine pour les staphylocoques-entérocoques, ertapénème pour les entérobactéries). Les mécanismes entraînant des phénotypes de résistance voisins et/ou le cumul de mécanismes de résistance rend difficile l'inférence du génotype (entérobactéries productrices de BLSE et/ou de céphalosporinases à haut niveau, voire de carbapénémases, éventuellement associées à une diminution de perméabilité). Le cotrimoxazole donne régulièrement une croissance traînante et une culture inhomogène. Les résistances inductibles tendent à donner des CMI dispersées (pénicilline des staphylocoques), et s'expriment après un temps de latence qui peut poser problème aux systèmes « rapides » (résistance inductible à la clindamycine) [3]. Les microplaques sont utilisables pour les streptocoques mais des difficultés sont rencontrées avec les β -lactamines et les macrolides. Les tests phénotypiques de confirmation recommandés par le CASFM/EUCAST doivent être mis en œuvre au moindre doute.

5. Conclusions et perspectives

L'automatisation de l'antibiogramme a pris des formes multiples. Les dispositifs, les systèmes et les panels disponibles sont en évolution constante, en réponse aux problèmes émergents et grâce aux nouvelles technologies. Les systèmes (semi)automatisés d'antibiogramme améliorent indiscutablement le flux de travail et la qualité des résultats. Les résultats obtenus pour les bactéries les plus couramment isolées en clinique sont globalement satisfaisants. Néanmoins, l'expertise des Biologistes reste indispensable pour contrôler les mécanismes de résistance de détection difficile.

Des développements très importants sont à venir. L'antibiogramme direct par inoculation de bouillons d'hémocultures positifs dans des automates n'est pas encore réalisé. Mais l'antibiogramme par des automates à courte durée d'incubation, couplé à une identification par le MALDI-TOF, avec des bactéries collectées à partir d'hémocultures positives par des méthodes variées permet déjà d'obtenir des résultats en moins de 24 h [28]. Les techniques génotypiques rapides de détection de mécanismes de résistance, notamment la PCR quantitative en temps réel, se sont multipliées [29]. Ces techniques ne peuvent pas remplacer l'antibiogramme dans la mesure où elles ne prédisent pas la CMI conférée ; de plus, elles ne permettent pas de détecter les nouveaux gènes de résistance. Par contre, elles sont un complément très utile à l'antibiogramme, en remplacement des tests phénotypiques de confirmation qui demandent 24 h. Les appareils qui réalisent ces tests pourraient à l'avenir être connectés au SIL [30]. La spectrométrie de masse, déjà associée aux automates à antibiogramme, a été appliquée

expérimentalement à la détection des mécanismes de résistance. Les techniques utilisées pourraient faire l'objet d'une commercialisation prochaine [29]

Actuellement, les fabricants d'automates à antibiogramme, qui commercialisent souvent d'autres appareils utilisés en bactériologie, proposent des composants Middleware permettant leur gestion intégrée [30]. Ainsi, le logiciel SIR WEB de i2a (Sirscan) permet de gérer à distance non seulement les lecteurs d'antibiogramme par diffusion de type SirSCAN 2000, mais aussi l'automate à coloration des lames RAL Stainer, l'analyseur automatisé de cytologie urinaire UriSed et l'automate à hémocultures VersaTREK, l'ensemencement Prelud, l'incubateur-lecteur Maestro, le système d'identification biochimique (SirSCAN micro et galeries Sirscan microID) et le spectromètre de masse (MALDI-TOF Biotyper). De même, le nouveau logiciel High-FlexX de MicroScan permet la connexion en réseau des différents postes de travail du même laboratoire et la connexion non seulement au SIL mais au Bruker MALDI Biotyper, à des lecteurs d'antibiogramme par diffusion et à des logiciels d'épidémiologie variés. Le Copan WASP Specimen Processor apporte une solution globale pour la gestion préanalytique des échantillons : inoculation, isolement, coloration de Gram et inoculation en bouillon. Le WASP est conçu comme une plate-forme ouverte modulaire pour l'ajout continu de nouvelles fonctionnalités et capacités, fournissant aux laboratoires les moyens de s'adapter facilement à l'évolution des besoins dans le futur. Avec le Phoenix, des postes de travail individuels équipés avec le logiciel de gestion des données BD Epicenter,

permettent à chaque technicien d'imprimer des codes-barres sur les cartes, optimisant le flux de travail. Les résultats peuvent être finalisés au niveau du Phoenix, du logiciel BD Epicenter ou du SIL. Le BD Epicenter permet de générer des rapports à partir des informations provenant de multiples instruments (Phoenix, MALDI-TOF Bruker, automate à hémocultures BACTEC MGIT 960). Le logiciel BD EpiCenter dispose aussi d'une interface bidirectionnelle avec le SIL qui permet l'analyse par le système BDXpert des résultats manuels indépendants du Phoenix [8]. Avec le Vitek 2, Le flux de travail des gros laboratoires peut être optimisé en plaçant des « Smart Carrier Station » à plusieurs postes. Le logiciel Myla a récemment été ajouté par bioMérieux pour gérer la connectivité de multiples appareils avec le SIL, permettant le suivi complet des résultats et des indicateurs de qualité. Les fonctions de Myla incluent un lien entre les identifications réalisées par la spectrométrie de masse du VITEK MS de bioMérieux et les antibiogrammes effectués par le Vitek 2, la validation à distance et l'entrée manuelle des résultats d'antibiogrammes, et la production de comptes rendus, y compris les antibiogrammes. L'Observa peut être utilisé pour réaliser des enquêtes épidémiologiques sur la base des données générées par le Vitek 2 et par l'automate à hémocultures, le BacT/Alert [8]. Ces interfaces multiples s'inscrivent dans le projet global de « l'automatisation totale du laboratoire » de bactériologie.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Soussy CJ. Bases de la catégorisation clinique. In L'antibiogramme. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E Ed., ESKA, 2012, p.39-48.
- [2] Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009, 49:1749-55.
- [3] Quentin C. L'antibiogramme automatisé : entre pièges et sécurité. Feuilles de Biologie. 2012, 53: 1-7.
- [4] Hombach M, Böttger E C, Roos M. The critical influence of the intermediate category on interpretation errors in revised EUCAST and CLSI antimicrobial susceptibility testing guidelines. Clin Microbiol Infect. 2012, 19: 59-71.
- [5] Winstanley T, Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2011, 24:515-56.
- [6] Kronvall G, Giske CG, Kahlmeter G. Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. Int. J. Antimicrob Agents. 2011, 38: 281-90.
- [7] Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Manual of Clinical Microbiology. Jorgensen, JH, Pfaller, MA Ed., ASM press, 2015, p.1253-73.
- [8] Karlosky JA, Richter SS. Antimicrobial susceptibility testing systems. In Manual of Clinical Microbiology. Jorgensen, JH, Pfaller, MA Ed., ASM press, 2015, p.1274-85.
- [9] Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2014, 20: 255-6.
- [10] Bourbeau PP, Ledeboer NN. Automation in clinical microbiology. J Clin Microbiol. 2013, 51: 1658-65.
- [11] Felmingham D, Brown DF. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2001, 48 Suppl. 1: 81-5.
- [12] Le Page S, Raoult D., Rolain JM. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method: a paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β -lactamases. Int J Antimicrob Agents. 2015a, 45: 61-5.
- [13] Hombach M, Maurer FP, Pfiffner T, Böttger EC, Furrer R. Standardization of operator-dependent variables affecting precision and accuracy of the disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2015, 53: 3864-69.
- [14] Le Page S, van Belkum A, Fulchiron C, Huguette R, Raoult D, Rolain JM. Evaluation of the PREViâ Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015b, 34: 1859-69.
- [15] Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader. BMC Microbiol. 2013, 13: 225.
- [16] Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens JL, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2003, 41: 3627-30.
- [17] Thornsberry C. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests. In Manual of Clinical Microbiology. Lennette, EH Ed., ASM press, 1985, p.1015-8.
- [18] Eigner U, Schmid A, Wild D, Bertsch D, Fahr MA. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the Vitek 2 and Phoenix systems. J Clin Microbiol. 2005, 43: 3829-34.
- [19] Junkins AD, Arbefeveille SS, Howard WJ, Richter SS. Comparison of BD Phoenix AP workflow with Vitek 2. J Clin Microbiol. 2010, 483: 1929-31.

- [20] Beuving J, Wolffs PF, Hansen WL, Stobberingh EE, Bruggeman CA, Kessels A, Verbon A. Impact of same-day antibiotic susceptibility testing on time to appropriate antibiotic treatment of patients with bacteraemia: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015, 34: 831-8.
- [21] Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol*. 1994, 32:1757-62.
- [22] Galar A, Yuste JR, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández-Crespo S, Leiva J. Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31: 2445-52.
- [23] Kuper KM, Boles DM, Mohr JF, Wanger A. Antimicrobial susceptibility testing: a primer for clinicians. *Pharmacotherapy*. 2009, 29: 1326-43.
- [24] Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, MacGowan AP, Rodloff A, Soussy CJ, Steinbakk M, Kahlmeter G. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect*. 2012, 18: E37-45.
- [25] Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park JA, Yu Y, Mumbowa F, Namaganda C, Mboowa G, Nakayita G, Armakovitch S, Chien G, Cho SN, Via LE, Barry CE 3rd, Ellner JJ, Alland D, Dorman SE, Joloba ML. SensititreMYCOTBMIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014, 58:11-8.
- [26] Buck GE, Kelly MT. Susceptibility testing of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, using broth microdilution panels. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982, 21:274-7.
- [27] Saini V, Riekerink RG, McClure JT, Barkema HW. Diagnostic accuracy assessment of Sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. *J Clin Microbiol*.
- [28] Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One*. 2014, 9:e87870.
- [29] Frickmann H, Masanta WO, Zautner AE. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. *Biomed Res Int*. 2014, 2014:375681.
- [30] Rhoads DD, Sintchenko V, Rauch CA, Pantanowitz L. Clinical microbiology informatics. *Clin Microbiol Rev*. 2014, 27: 1025-47.

Avantages et limites des différents systèmes d'automatisation en bactériologie

Gilbert Greub^a, Guy Prod'homme^a, Antony Croxatto^a

RÉSUMÉ

Les laboratoires de diagnostic moléculaire et de sérologie ont été automatisés depuis de nombreuses années. Aujourd'hui, la bactériologie entre également dans l'ère de l'automatisation grâce à de nouvelles solutions IT, grâce à l'usage de milieux liquides pour les frottis, et grâce à la disponibilité du MALDI-TOF pour l'identification bactérienne. Cette automatisation des laboratoires diagnostiques améliore l'efficacité, réduit les coûts et peut aussi réduire à terme le temps de rendu des résultats par une détection précoce de la croissance des colonies à l'aide de nouveaux algorithmes de détection de leur croissance. Cependant, pour tirer pleinement parti des avantages des solutions automatisées, il ne faut pas envisager une simple robotisation des activités humaines, mais réorganiser de manière globale les procédures et le *workflow*. Ainsi, l'automatisation pourra réduire les délais de rendu de résultats et améliorer significativement la qualité avec un bénéfice escompté sur les soins aux patients.

**Automate - bactériologie diagnostique -
ensemencement - incubation intelligente - télébactériologie.**

SUMMARY

Advantages and limitations of various bacteriological automation systems

Molecular diagnosis and serology laboratories have been automated since several years. Today, culture-based bacteriology is moving towards automation thanks to improved middleware, to new IT solutions, to the use of liquid media for swabs and to availability of MALDI-TOF identification. This automation of diagnostic laboratories will improve the efficiency, will reduce the costs, and may also reduce the time to results thanks to earlier detection of colonial growth, by using novel detection algorithms. However, to be fully beneficial, automation should not only rely on a robotisation of human tasks, but should on the contrary be considered as a unique opportunity to fully re-organize the laboratory workflow with well (re) defined lean management processes. This reduced time to results and improved quality should ultimately benefit to patients care.

**Automation - molecular diagnosis - sowing -
intelligent incubation - telebacteriology**

1. Introduction

Près de 70 % des décisions médicales se basent sur des résultats de laboratoire [1, 2]. Ce taux est également valable pour les résultats provenant des laboratoires de bactériologie. En effet sous la pression économique croissante, seules les analyses ayant une valeur ajoutée évidente sont actuellement réalisées dans les laboratoires de microbiologie médicale modernes. Ainsi, par exemple, à Lausanne, nous avons récemment abandonné les cultures en routine des frottis vaginaux qui révélaient très souvent une flore physiologique, pour limiter les cultures aux échantillons présentant un examen microscopique inhabituel ou provenant de patientes avec une situation clinique particulière. Cette stratégie a permis de réduire de 97 % les cultures des frottis vaginaux.

^a Laboratoires de microbiologie médicale diagnostique
du centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV)
Institut de Microbiologie
Rue du Bugnon 48
1011 Lausanne
Suisse

* Correspondance
gilbert.greub@chuv.ch

Parmi les analyses ayant une valeur ajoutée très importante, mentionnons l'analyse des hémocultures positives. Ainsi lors d'hémocultures positives à bacille Gram négatif, 20 % environ des examens de Gram effectués immédiatement sur un culot du bouillon d'hémocultures positives vont influencer l'antibiothérapie donnée et près de 35 % des résultats de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) auront un impact sur une décision d'élargissement ou de réduction du spectre des antibiotiques utilisés pour traiter le patient [3]. De plus, même si l'examen de Gram et le MALDI-TOF n'ont pas un impact direct sur le traitement antibiotique, les analyses de la sensibilité aux antibiotiques faites ultérieurement auront également un impact sur les décisions thérapeutiques, permettant de réduire encore le spectre antibiotique dans une tranche d'environ 20 % des cas. Enfin, dans cet exemple extrême qui est l'hémoculture positive, même si l'identification microbienne par examen de Gram et ou MALDI-TOF ainsi que la sensibilité aux antibiotiques n'ont pas un impact direct sur une décision médicale, ces résultats peuvent modifier la prise en charge du patient par la nature du germe identifié. À titre d'exemple, l'identification d'un streptocoque *Streptococcus gallolyticus* dans les hémocultures va inciter le clinicien à rechercher une tumeur colique en raison

article reçu le 31 décembre 2015, accepté le 31 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

de l'association qui existe entre l'espèce *S. gallolyticus* (anciennement *S. bovis*) et les tumeurs digestives [4]. De même, la durée de l'antibiothérapie dans une bactériémie isolée est dépendante de l'identification du germe et une prolongation du traitement pour 14 jours au total est généralement recommandée pour des bactériémies à *Staphylococcus aureus* et à *Pseudomonas sp.*, alors qu'un urosepsis non-complicqué à *Escherichia coli* sera généralement traitée pour une durée inférieure.

En résumé, les tests diagnostics peuvent avoir un impact majeur sur la santé et la prise en charge des patients et dans ce contexte, il est essentiel de viser une amélioration qualitative et de la coupler à un certain degré d'automatisation, afin de répondre à la demande toujours croissante du nombre d'échantillons à traiter. Cette demande accrue de tests ne peut être contenue même avec une stratégie d'arrêt des prestations à faible valeur ajoutée discutée ci-dessus (culture des frottis vaginaux). En effet son origine est multifactorielle et est la conséquence par exemple à Lausanne, notamment des facteurs suivants :

- l'accroissement du nombre de lits sur la cité hospitalière (environ 4 % par an),
- l'offre accrue en termes de tests diagnostiques (> 90 PCR's différentes en 2016 proposées à Lausanne contre une dizaine en 2005 [5]),
- le nombre croissant de patients recevant des immunosuppresseurs et/ou des traitements induisant des neutropénies (transplantés de moelle osseuse ou d'organes solides, patients avec connectivites et/ou maladies inflammatoires, agranulocytose et immunomodulation dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses).

Dans de nombreux laboratoires de microbiologie, les limitations de budget et la réduction en personnel sont des défis importants. L'automatisation paraît une solution idéale pour faire face à ces défis, puisqu'elle permet d'absorber plus facilement le nombre croissant de demandes en maintenant une excellente qualité et en augmentant l'efficacité et la productivité de nos laboratoires.

Cette automatisation a été effectuée depuis de nombreuses années en chimie clinique, en hématologie et plus récemment en biologie moléculaire [5]. Cependant, la microbiologie a été longtemps considérée comme étant trop complexe et avec des volumes trop petits pour être automatisée. L'avènement de nouvelles technologies tel que le MALDI-TOF, qui aujourd'hui permet d'identifier plus de 95 % des bactéries isolées à partir d'échantillons cliniques [6], permet d'envisager plus sereinement un laboratoire entièrement automatisé. De plus, la disponibilité de milieux de transport liquide pour les frottis (par exemple ESwab commercialisés par Copan) est un autre facteur important ayant permis le développement de l'ensemencement automatisé puisque les robots sont conçus pour pipetter des échantillons liquides [7]. Enfin, les contraintes budgétaires ont amené à une consolidation des petits laboratoires en des consortiums de laboratoires plus importants pouvant traiter de plus grands volumes d'échantillons et rendant l'automatisation également nécessaire dans le domaine de la microbiologie.

L'automatisation en bactériologie se développe maintenant rapidement. Les premiers progrès ont été de connecter de manière bi-directionnelle plusieurs systèmes automatisés individuels (Identification par MALDI-TOF, identification automatisée et sensibilité aux antibiotiques automatisée de type Vitek® (Bio-Mérieux) et Phoenix® (Becton Dickinson)) via le système informatique de laboratoire (LIS) ou par l'intermédiaire de « middleware ». De plus, les systèmes de détection de culture utilisés par exemple pour les mycobactéries ou plus largement pour les hémocultures, sont également des systèmes automatisés précieux pour le laboratoire de bactériologie qui ont permis un accroissement de la qualité et une réduction du temps jusqu'à l'obtention du résultat. Cependant pour l'instant, ces systèmes sont des automates dédiés, et non inclus dans le flux global des échantillons de bactériologie. Le laboratoire automatisé est un système incluant les automates d'ensemencement, les incubateurs intelligents, l'imagerie digitalisée des géloses et la télébactériologie qui grâce à une interface informatique performante permet une approche intégrée des différentes étapes avec un gain d'efficacité [8, 9]. Nous estimons ce gain pour notre laboratoire à 2.4 EPTs sur un total de 17 EPTs actuels [10]. De plus, le prélèvement automatisé des colonies, la préparation de plaques pour l'identification par MALDI-TOF et la préparation automatisée de suspensions bactériennes pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, vont compléter la gamme disponible actuellement et totalement révolutionner la prise en charge des échantillons dans les laboratoires de microbiologie diagnostique.

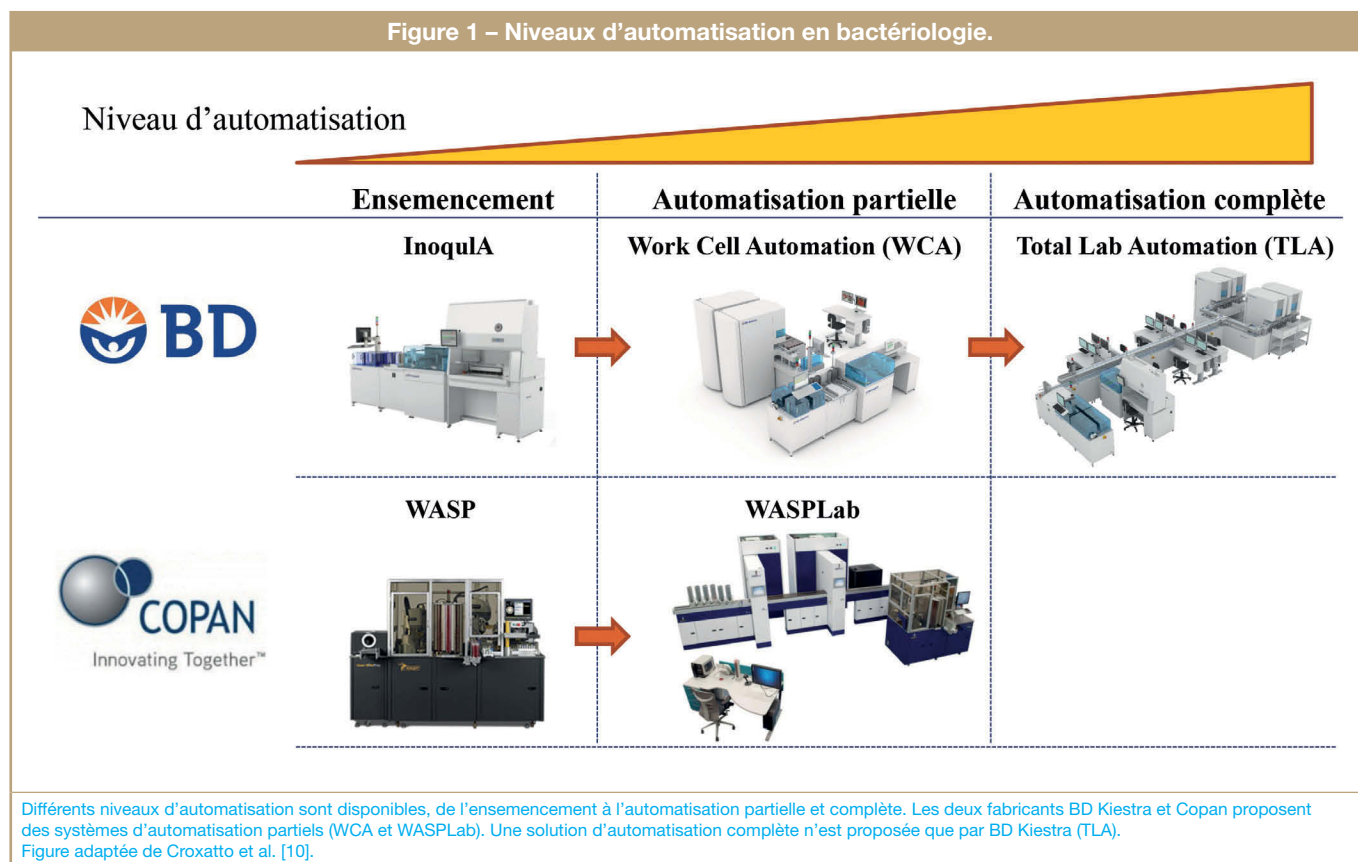
2. Les systèmes automatisés disponibles sur le marché actuellement

Suite à l'arrêt du développement du laboratoire entièrement automatisé (FMLE®) couplé à son système d'ensemencement (Previ-Isola) initialement proposé par bio-Mérieux, seuls deux producteurs majeurs, BD Kiestra et Copan, se partagent le marché de l'automatisation actuellement. Ces deux industriels proposent chacun un système d'ensemencement (Inoqua et WASP) et un système d'automatisation partiel (WCA et WASPLab) du laboratoire de bactériologie (figure 1). Par ailleurs, BD-Kiestra propose également une constellation d'automates entièrement connectés (TLA). Aujourd'hui, en 2016, ces systèmes ont été installés dans plus d'une centaine de laboratoires de par le monde. Basé sur ces expériences préliminaires, il est utile de définir les points essentiels qui pourront guider l'utilisateur dans le choix d'un ensementeur ou d'un système entièrement automatisé le plus approprié pour son laboratoire.

3. Les ensementeurs automatisés

Récemment, nous avons publié deux articles sur le thème de comment choisir son ensementeur [7, 10]. Dans ces articles, nous avons identifié principalement

Figure 1 – Niveaux d'automatisation en bactériologie.



5 paramètres importants qui permettent de guider le choix de l'ensemencement automatisé et qui sont listés dans le **tableau 1**. Parmi ces différents critères, certains éléments sont évidemment indispensables tels que l'ouverture et la fermeture automatisée des échantillons, rendant caduque l'utilisation de certains automates de 1^{re} génération. D'autres éléments doivent être pondérés de manière

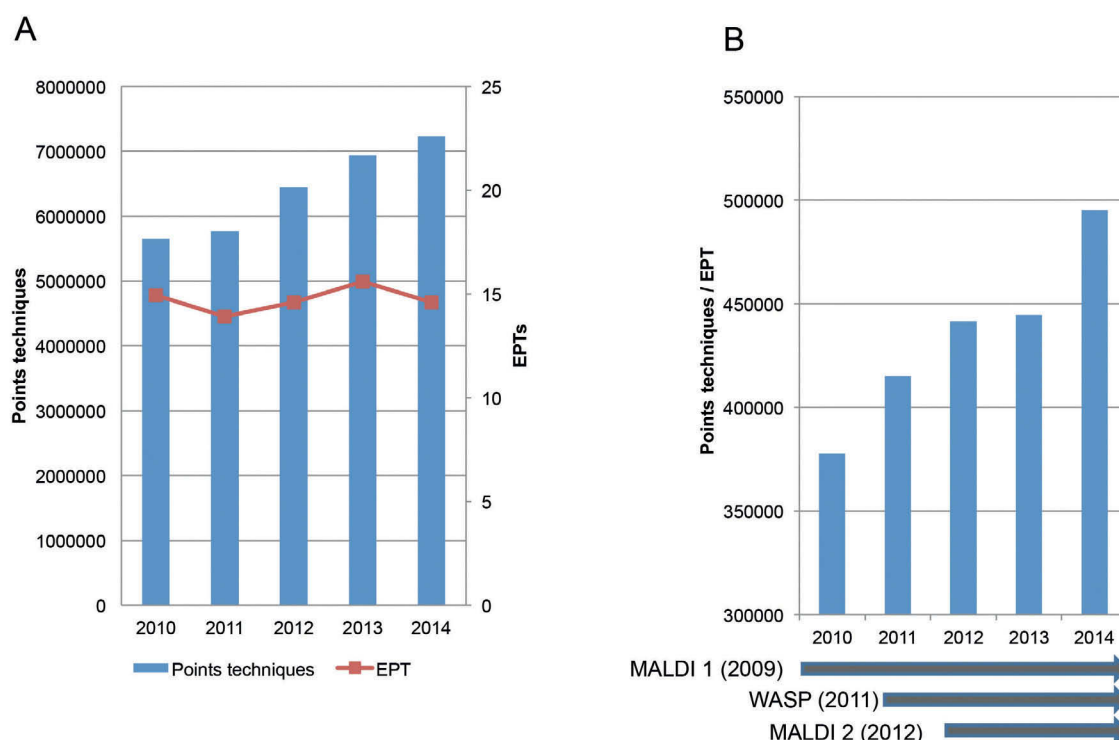
plus ou moins significative selon les priorités du laboratoire et la diversité d'échantillons traités. Cependant, quel que soit l'automate, le bénéfice pour le laboratoire est évident en termes de qualité et d'économie de personnel. Ainsi, à Lausanne, suite à l'acquisition d'un WASP et à l'introduction de 2 MALDI-TOFs, nous avons pu accroître significativement la productivité de notre laboratoire (**figure 2**). Cependant, le gain EPT (gain en équivalent plein-temps) correspondant à un technicien en analyses biomédicales n'a été effectif que 12 mois après la livraison du WASP car une période de formation et d'adaptation est nécessaire avant d'avoir le rendement escompté. Outre ce gain d'efficacité, les incubateurs automatisés permettent d'accroître un gain qualitatif majeur par rapport aux méthodes manuelles notamment en augmentant le nombre de colonies isolées, permettant d'accroître le nombre de pathogènes identifiés et de réduire le temps d'obtention des résultats en évitant des sous-cultures pour isoler les différents agents microbiens cultivés [11, 12, 13].

4. Les incubateurs intelligents

Afin d'avoir une bactériologie entièrement automatisée, il est important de disposer, au sein de la chaîne automatisée, d'une grande capacité de stockage des plaques permettant leur incubation dans une atmosphère appropriée et à une température définie. Chaque plaque stockée individuellement doit être rapidement disponible pour suivre la croissance par imagerie et pour pouvoir redistribuer cette gélose chaque fois que des tests

Tableau 1 – Cinq critères principaux permettant de choisir son ensemencement automatisé.	
Critères	Commentaires
État du marché	Inoqula (BD-Kiestra) Previ-isola (Bio-Mérieux) Wasp (Copan) Prelud (I2A) Autoplak (NTE healthcare)
Données techniques	Capacités, débit, technologie, maintenance
Flux de travail des ensemencement	Travail en continu Travail en batch
Performance et impacts attendus	Taille du laboratoire Type d'institution (universitaire ou non) Type de patients Type d'échantillons
Analyse des flux et des spécificités de laboratoire	Compatibilité avec les systèmes existants Budget et capacité de réorganisation Surface de laboratoires disponibles

Figure 2 – Augmentation du volume analytique et de la productivité du laboratoire.



(A) Une augmentation constante du volume d'échantillons a été observée entre 2010 et 2014 (2015) au laboratoire de bactériologie du CHUV, Lausanne. (B) L'absorption de cette augmentation n'a pu être réalisée qu'en augmentant la productivité du laboratoire (Points techniques / EPT) sans engagement significatif d'EPT supplémentaire, grâce notamment à l'introduction de 2 MALDI-TOFs (en 2009 et en 2012) et d'un système d'ensemencement automatisé (WASP en 2011).

complémentaires sont souhaités, tels que l'identification par MALDI-TOF, la sensibilité aux antibiotiques ou des tests biochimiques éventuels. Les incubateurs intelligents devraient (i) augmenter la qualité et la rapidité de croissance des bactéries grâce à une température plus uniforme et plus constante (ii), améliorer la traçabilité à l'aide de barres-codes et d'un système d'indexation et enfin ce type de gestion des plaques devrait (iii) améliorer la sécurité au laboratoire en évitant la chute de plaques pouvant libérer des spores de champignons ou des aérosols de bactéries diverses. Les différents incu-

bateurs intelligents disponibles sont tous associés à un système d'imagerie automatisé (*cf ci-dessous*) afin de pouvoir effectuer une lecture digitalisée des gélases sur écran. Différents systèmes robotiques ou conceptions technologiques sont utilisés [10] pouvant définir des flux de plaques et des priorités de tâches différentes. Selon les systèmes automatisés, la variété des échantillons, les protocoles d'ensemencement et d'incubation ainsi que l'organisation du laboratoire autour du système automatisé, les priorités des tâches de prise d'image, de chargement et de déchargement peuvent varier afin d'optimiser le flux analytique. Ainsi à titre d'exemple, BD-

Kiestra suggère de définir les degrés de priorités de la façon suivante : (1) imagerie des gélases (2) déchargement des gélases positives pour effectuer des tests complémentaires, (3) chargement des gélases ensemencées et (4) déchargement des gélases négatives destinées à être jetées. Cependant, ces priorités peuvent être modifiées et adaptées en fonction des flux du laboratoire. Le **tableau 2** résume certaines caractéristiques importantes pouvant influencer le flux des plaques et qui sont à prendre en considération lors du choix d'incubateurs intelligents.

Tableau 2 – Comparaison entre les systèmes automatisés commercialisés par BD-Kiestra et par Copan.

Caractéristiques	BD-Kiestra	Copan
Capacité	1 152 plaques	882-1 764 plaques
Chargement des plaques	600 plaques/heure	360 plaques/heure
Déchargement des plaques	600 plaques/heure	250 plaques/heure
Chargement + imagerie des plaques	300 plaques/heure	250 plaques/heure
Déchargement + imagerie + chargement des plaques (plaques incubées dans les incubateurs automatisés)	150 plaques/heure	120 plaques/heure
Chargement + imagerie + déchargement des plaques (plaques incubées dans des incubateurs externes)	163 plaques/heure	100 plaques/heure

5. Imagerie digitalisée

L'imagerie digitalisée est une des grandes valeurs ajoutées du système automatisé en bactériologie. Il existe différents types de caméras selon les systèmes avec des capacités différentes, notamment en termes de résolution étant respectivement de 48 Mp (mégapixels) pour le système WaspLab et de 5 Mp pour les systèmes de BD-Kiestra. Si la qualité des images est actuellement clairement supérieure avec le système WASPLab, la taille importante des fichiers de données accumulées devant être gérée par le laboratoire questionne l'utilité d'une qualité d'image si importante pour une lecture de routine. Les différents systèmes disponibles actuellement proposent différentes sources de lumière (dessus, dessous, de côté), afin (1) d'optimiser l'observation phénotypique des colonies (hémolyse, couleur, taille...) et (2) de fournir les conditions d'imagerie nécessaire pour le développement d'algorithme de traitement d'image (optimisation du contraste et du signal par rapport au bruit de fond) permettant par exemple de détecter des colonies difficilement visibles à l'œil nu.

Ces images digitalisées autorisent une visualisation à distance sur des écrans dédiés, action généralement appelée « télébactériologie ». La télébactériologie permet au personnel technique impliqué dans la lecture des géloses de travailler dans un endroit calme, loin des odeurs et des agitations du laboratoire. Cet environnement protégé réduit la pénibilité du travail et accroît la productivité. Cette lecture peut être facilitée par une lecture de dépistage automatisé. Ainsi par exemple, les géloses stériles peuvent être rendues sur simple validation du dépistage automatisé, voire à terme sans le moindre contrôle complémentaire. Dans un laboratoire tel que le nôtre où 2 000 géloses sont lues quotidiennement avec près de 30 % de stériles, ce type d'option d'une lecture et validation automatisées des géloses stériles peut permettre un gain d'efficacité du laboratoire. D'autre part, les urines constituent plus de 20 % des échantillons dans la plupart des laboratoires. Il est probable que dans un futur proche, une détection automatisée des germes les plus fréquents, tel qu'*Escherichia coli*, puisse être implémentée, permettant un gain de productivité supplémentaire pour le laboratoire. Bien entendu, ces lectures automatisées vont bien au-delà de l'imagerie dite digitalisée et de la télébactériologie mais nécessitent une solution informatique globale et rendent compte de l'importance de la qualité des logiciels proposés [14]. Ces logiciels doivent donc être parfaitement

connectés au LIS (système d'information du laboratoire) et adaptés aux divers automates constituant la chaîne d'automatisation afin que cette dernière puisse être utilisée de façon optimale.

6. Conclusion

L'automatisation de la bactériologie est actuellement disponible pour trois étapes importantes du flux analytique microbiologique, l'ensemencement, l'incubation et la lecture (imagerie). Le choix des appareils est complexe et doit tenir compte non seulement de la phase d'inoculation [7], mais également des incubateurs automatisés, des systèmes d'imagerie et des logiciels associés [10]. L'automatisation devrait permettre une productivité accrue en améliorant le flux de travail du laboratoire mais également en augmentant significativement la qualité et la productivité des étapes d'ensemencement et d'incubation. Globalement, l'automatisation devrait amener à une réduction du temps d'obtention des résultats et à une meilleure traçabilité [15]. Enfin, en réduisant les tâches répétitives et fastidieuses telles que l'inoculation et la gestion des plaques, un temps additionnel pour des tâches à valeurs ajoutées pourrait être récupéré [16].

Cependant ces avantages théoriques de l'automatisation peuvent être annihilés si le laboratoire ne se réorganise pas et ne s'adapte pas au système automatisé [17]. Parmi les désavantages pressentis de l'automatisation mentionnons la perte d'expertise notamment concernant la détection de caractéristiques phénotypiques comme l'odeur des souches (odeur de beurre de *S. milleri* ou odeur de bonbons acidulés de *P. aeruginosa*) et la consistance des colonies. Enfin, il est essentiel d'avoir une solution de « back-up » en cas d'arrêt du système automatisé et dans cette optique, une maintenance régulière est essentielle. Son coût annuel, de l'ordre de 5 à 10 % du prix d'achat, doit être considéré d'emblée dans le budget.

En conclusion, l'automatisation de la microbiologie permet d'accroître l'efficacité, de réduire le temps nécessaire à obtenir des résultats (détection de colonies, identification et sensibilité aux antibiotiques) et d'apporter un gain de qualité qui devrait se traduire par des bénéfices indirects pour les patients.

Conflits d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Forsman RW. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? Clin Chem. 1996; 42: 813-816.
- [2] Wians FH. Clinical laboratory tests: Which, why, and what do the results mean? Labmedicine. 2009; 40
- [3] Clerc O1, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. Clin Infect Dis. 2013 Apr;56(8):1101-7.
- [4] Corredoira J, Alonso MP, Coira A, Varela J. Association between Streptococcus infantarius (formerly S. bovis II/1) bacteremia and noncolonic cancer. J Clin Microbiol. 2008 Apr;46(4):1570.
- [5] Greub G, Brouillet R, Sahli R, Jaton K. Automation of molecular diagnosis. Future Microbiol, in press.
- [6] Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):380-407.

- [7] Greub G, Prod'hom G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect.* 2011 May;17(5):655-60.
- [8] Mulatero F, Bonnardel V, Micolaud C. The way forward for fast microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May;17(5):661-7.
- [9] Matthews S, Deutekom J. The future of diagnostic bacteriology. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May;17(5):651-4.
- [10] Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y, Greub G. Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):217-35.
- [11] Froment P, Marchandin H, Vande Perre P, Lamy B. Automated versus manual sample inoculations in routine clinical microbiology: a performance evaluation of the fully automated Inoqula instrument. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):796-802.
- [12] Does bacteriology laboratory automation reduce time to results and increase quality management? Dauwalder O, Landrieu L, Laurent F, de Montclos M, Vandenesch F, Lina G. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):236-43.
- [13] Croxatto A, Dijkstra K, Prod'hom G, Greub G. Comparison of Inoculation with the Inoqula and WASP Automated Systems with Manual Inoculation. *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2298-307.
- [14] Da Rin G, Zoppelletto M, Lippi G. Integration of Diagnostic Microbiology in a Model of Total Laboratory Automation. *Lab Med.* 2016 Feb;47(1):73-82.
- [15] Burnham CA, Dunne WM Jr, Greub G, Novak SM, Patel R. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Chem.* 2013 Dec;59(12):1696-702.
- [16] Lina G, Greub G. Automation in bacteriology: a changing way to perform clinical diagnosis in infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):215-6.
- [17] Dauwalder O, Vandenesch F. Clinical microbiology laboratory: from the Pasteur model to the 24/7 clinical chemistry concept. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Oct;20(10):O593-4.

Impact de l'automatisation sur l'organisation d'un laboratoire de bactériologie

Marie Laure Joly Guillou^a

RÉSUMÉ

Au cours des 30 dernières années, le fonctionnement des laboratoires de bactériologie a considérablement évolué. Nous sommes passés d'une discipline artisanale et manuelle à une discipline partiellement automatisée pour arriver à court terme à une automatisation globale. Ce changement provoque de nombreuses transformations dans la conception du métier de bactériologiste. Les techniques comme la biologie moléculaire ou la spectrométrie de masse ont largement contribué à ce changement. Les techniciens et biologistes doivent se réinventer un nouveau métier face à ce challenge du troisième millénaire. La spécificité du métier ne doit pas disparaître au sein de l'ensemble des plateaux techniques totalement automatisés de la biologie d'aujourd'hui. L'expertise tant technique que biologique doit rester présente tant pour le bénéfice du patient que pour le dialogue avec les cliniciens et le bactériologiste doit continuer à rester un acteur incontournable de la prise en charge des pathologies infectieuses.

Automatisation - automation - évolution - microbiologie - organisation.

1. Introduction

L'idée que la microbiologie est une discipline trop complexe pour être automatisée et qu'aucune machine ne peut remplacer l'homme dans ce domaine est bien révolue. L'automatisation de la bactériologie n'est plus un mythe. Depuis les années 80 qui ont vu les premiers automates arriver sur le marché, le fonctionnement de la bactériologie a considérablement évolué. Toutefois, un des caractères particuliers de ces automates est de ne remplir qu'une fonction partielle de l'analyse pour laquelle ils sont destinés. Ainsi, l'automate d'hémoculture reste encore un appareil d'incubation et de dépistage de flacons positifs (par mesure du dégagement de CO₂ par les bactéries). Il reste à la charge des techniciens, la réalisation de l'analyse bactériologique du bouillon contenu dans le flacon (mise en culture sur gélose, identification et antibiogramme). Il en est ainsi pour la plupart des automates, même si au cours du temps leur ergonomie et leur technicité se sont largement améliorées [1,2,3]. Considérons aujourd'hui la photographie d'un laboratoire de bactériologie clinique en France (figure 1). Elle nous montre une alternance

^a Laboratoire de bactériologie du CHU ANGERS

4 rue Larrey – IBS
49033 - Angers

* Correspondance

MLJoly-Guillou@chu-angers.fr

SUMMARY

Impact of automatization on organization in a clinical microbiology laboratory

In the last 30 years, the functioning of bacteriological laboratories has evolved considerably. We have moved from a craft activity to a discipline manual and partially automated to achieve in a short term to an overall automatization. This change causes many disturbances in the design of the bacteriologist work. Techniques such as molecular biology and mass spectrometry have contributed to this change. Technicians and biologist have to reinvent themselves a new profession in front of the challenge of the third millennium. The specificity of this profession shall not disappear within all the biology technical platforms fully automated today. The expertise both technical and biological must remain present both for the benefit of the patient and for the dialogue between clinicians and bacteriologists. The bacteriologists must continue to remain a key player in the management of infectious diseases.

Automatization - automation - evolution - microbiology - organization.

d'automates et de postes de travail manuel. Aux côtés des automates d'hémocultures, on compte aujourd'hui des appareils de coloration de Gram, des ensemencement, des cytomètres de flux destinés à la cytologie urinaire, des spectromètres de masse destinés à l'identification bactérienne, des automates d'antibiogramme et d'identification biochimique bactérienne en milieu liquide, des caméras de lecture automatique des antibiogrammes en milieu solide et tout l'arsenal de biologie moléculaire qui s'est développé parallèlement ces dernières années (PCR, Extracteurs, séquenceurs...) [4]. Les techniciens assurent toujours une activité manuelle qui fait le lien entre les différentes étapes. Chaque automate peut être relié au Système de gestion de laboratoire (SGL) et certains peuvent être reliés entre eux, mais l'ensemble ne constitue pas une chaîne complète. Cependant, en 2015, la chaîne d'automatisation complète existe et commence tout juste à s'implanter dans de rares laboratoires privilégiés. Son coût est aujourd'hui très élevé et cela prendra encore quelques années avant qu'elle ne fasse partie du paysage microbiologique. [5,6]. Cette évolution a entraîné et entraîne encore de profondes modifications dans l'organisation d'un laboratoire avec ce que cela implique d'adhésion ou de réticences autour des projets d'automatisation dans une discipline qui prônait le savoir-faire de la prise en charge manuelle des analyses

Article reçu le 31/12, accepté le 31/1/2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 1 – Photographie d'une zone automatisée conjointe à une zone d'activité manuelle.



bactériologique comme un véritable art. Ce changement passe donc par une acceptation et un apprentissage de la prise en charge des automates ainsi qu'une réorganisation des tâches de chacun en fonction du positionnement de ces appareils au sein du laboratoire. Au troisième millénaire, l'automatisation de notre discipline est donc une réalité dont l'objectif est de faciliter le travail des techniciens sur les tâches répétitives et non ergonomiques, améliorer la fiabilité et la répétabilité du rendu des analyses et améliorer la protection du personnel vis-à-vis des agents infectieux. Au cours des 30 dernières années, notre discipline a elle-même beaucoup évolué avec la découverte de nombreuses espèces bactériennes, des modifications taxonomiques permanentes. L'augmentation du travail quotidien en lien avec les attentes des cliniciens et l'accréditation COFRAC représentent de puissants moteurs vis-à-vis de l'automatisation qui favorise la standardisation et des gains de

temps. Cette révolution inéluctable passe par une évolution des mentalités et une modification des comportements psychosociaux.

2. Historique et évolution technologique

La modernisation des laboratoires de bactériologie hospitaliers a véritablement commencé en 1968-1969 avec l'arrivée de la miniaturisation des galeries d'identification qui ont pris la place des galeries en tubes de type Pastorien. (www.biomerieux.com.cn/upload/ApiGallery.pdf) [7]. De nombreuses réticences se sont élevées à cette époque, mais ce progrès a rapidement fait son entrée dans tous les laboratoires de bactériologie clinique et a été, dès 1979, adopté par le monde entier (figures 2 et 3).

Figure 2 – Étape de l'automatisation en bactériologie depuis 1970 : d'après Martin C et Garnier F dans « Bactériologie Médicale » 2^{ed} F Denis et al.

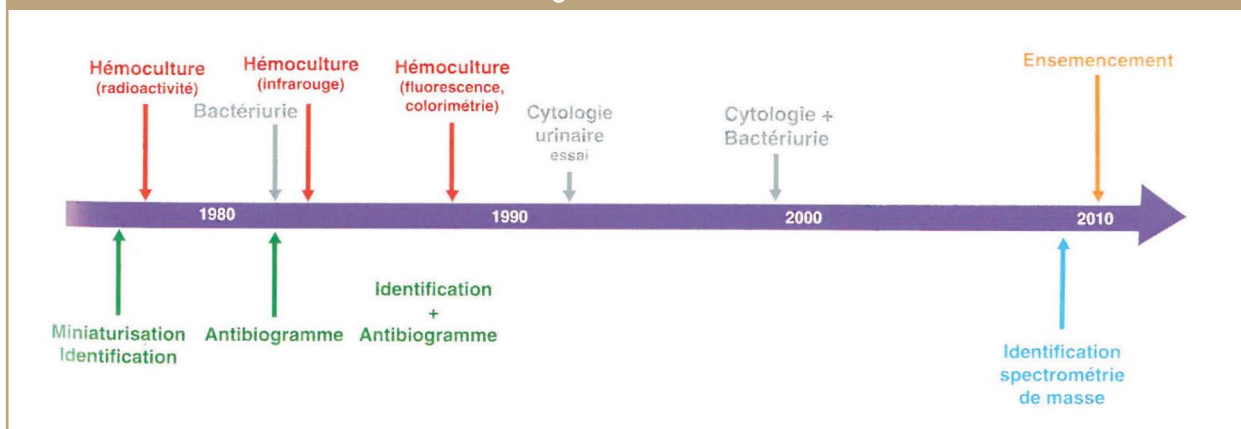


Figure 3 – ?????????????



A: Miniaturisation des tests par la Galerie API

B: Mise en évidence du caractère fermentaire (A) ou oxydatif (B) avec un milieu dit de MEVAG contenant du glucose
D'après le site de Microbiologie Médicale: <http://www.microbes-edu.org/>

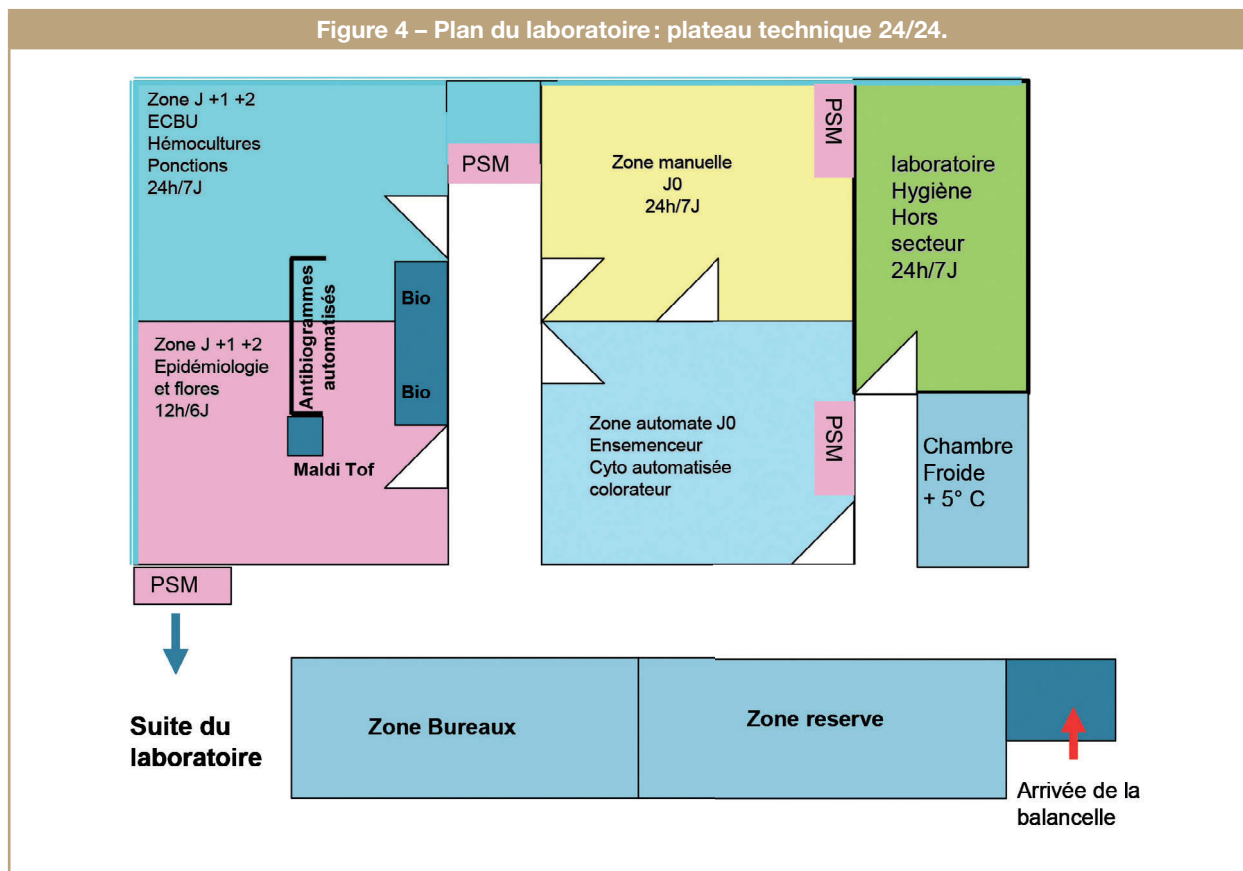
La deuxième étape, tout aussi importante, a été l'introduction des premiers automates d'hémocultures dans les années 70-80. À cette époque, les hémocultures étaient encore observées à l'œil nu et en transparence, flacon par flacon de façon biquotidienne. La quantité de flacons d'hémoculture adressée au laboratoire de bactériologie est devenue rapidement trop importante, la manutention des plateaux difficile et la lecture peu performante. L'automatisation a donc permis de remplacer un travail fastidieux et non ergonomique par une machine à détection plus fiable, rapide (1 à 2 jours), à lecture continue et qui n'a jamais cessé de s'améliorer techniquement: sensibilité de la détection et milieux de culture de plus en plus performants (Entérobactéries détectées en moyenne à 7 h d'incubation, *S pneumoniae* détecté en moyenne à 6 h d'incubation) [8]. En dehors de l'hémoculture, les deux applications majeures suivantes ont été l'identification avec l'intégration de la taxonomie bactérienne ainsi que la lecture et l'interprétation de l'antibiogramme, domaine particulièrement prisé par l'école Française. Ces automates ont permis de lancer l'automatisation avec les logiciels d'épidémiologie indispensable aujourd'hui au suivi de la résistance bactérienne mondiale. L'introduction « tranquille » de cette automatisation a permis aux personnels des laboratoires de bactériologie d'intégrer lentement la notion d'automatisation tout en conservant leur bien le plus cher, l'expertise microbiologique. La suite de l'histoire se fait dans le même esprit avec l'arrivée des ensemenciers, des cytomètres urinaires et des colorateurs de Gram. [9,10,11]. Ces dernières années ont cependant surtout été marquées par l'arrivée des spectromètres de masse comme outils d'identification bactérienne performant et rapide [12]. La prochaine étape concerne les « étuves intelligentes » (incubation et lecture automatique par caméra

des boîtes de pétri ensemencées) associées au réseau informatique qui permettra le lien entre tous les automates d'un même laboratoire. Cette organisation est déjà en place dans certains pays d'Europe comme les Pays-Bas mais représente aujourd'hui un coût extrêmement élevé à l'implantation [11,13]. Se pose alors la question cruciale: quel rôle pour les techniciens et pour les biologistes? Quelle formation pour les nouveaux professionnels?

3. Vers une organisation rationnelle

La standardisation, l'amélioration de la sensibilité de la spécificité, la reproductibilité, l'exactitude, la fiabilité, la traçabilité, les contrôles de nos analyses et la suppression des tâches répétitives sont les bénéfices acquis de l'automatisation. [14] Cette dernière permet également au laboratoire d'assumer une forte augmentation de l'activité. L'organisation du laboratoire évolue en fonction de ces changements. En milieu hospitalier, il y a toujours eu différentes façons d'envisager le fonctionnement d'un laboratoire de bactériologie. Ainsi par exemple, l'un des fonctionnements le plus ancien et le plus classique consiste à traiter les analyses par type de prélèvement (paillasse ECBU, hémoculture...). Cette façon de fonctionner offre l'avantage de la performance productive technique mais trouve ses limites dans l'intérêt du travail moindre pour les techniciens (tâches répétitives) et la relation clinico biologique, car il ne permet pas spontanément de gérer un dossier patient complet. L'organisation par secteur hospitalier a été largement plébiscitée à partir des années 80-90. Elle se révèle consommatrice de temps technique

Figure 4 – Plan du laboratoire : plateau technique 24/24.



(chaque paillasse réalise tous les prélèvements d'un même patient) mais très efficace sur le plan du dialogue clinico biologique et de l'intérêt du travail technique. Il faut néanmoins que les locaux s'y prêtent. En effet la géographie des lieux est un pré requis à une organisation efficace. Un laboratoire constitué de petites pièces aura des difficultés à s'organiser en secteur.

L'automatisation et l'informatique ont modifié notre vision des choses. En effet, il est difficile de démultiplier les automates dans tous les secteurs d'un laboratoire. Il faut donc s'organiser pour mutualiser ce matériel pour l'ensemble du laboratoire. Dans ce cadre la réorganisation se fait d'elle-même. Un secteur s'organise naturellement pour accueillir les prélèvements et permet l'ensemencement, la cytologie urinaire et la coloration de Gram par les automates. Une fois cette partie réalisée les prélèvements peuvent être redistribués dans des laboratoires organisés en secteurs hospitaliers ou par prélèvement selon les choix et les possibilités de chacun. Sur le CHU d'Angers, par exemple, le choix a été de redistribuer les analyses ensemencées sur deux secteurs : 1 secteur urgent fonctionnant 24 h/7 J (hémocultures, urines, ponctions-prélèvements profonds) et un secteur non urgent fonctionnant 12 h/6 J (prélèvements superficiels – flores épidémiologie). Entre les deux laboratoires un secteur ouvert héberge les automates d'antibiogrammes et le spectromètre de masse destiné à l'identification bactérienne (figure 4).

L'automatisation et l'informatisation ont également permis d'accélérer la transmission des informations et quelques études permettent de mettre en évidence le gain obtenu

par rapport au délai de rendu du résultat. Il est plus difficile de mettre en évidence le gain obtenu par rapport au patient lui-même [15,16]. Le passage au fonctionnement 24 h sur 24 / 7 jours sur 7 pour lequel certains laboratoires optent aujourd'hui associé au serveur informatique permet d'améliorer encore ce délai de rendu longtemps critiqué par les cliniciens et qui peut être raccourci ainsi de 24h voire aller jusqu'à 36 heures. [17,18,19]

En se projetant dans un avenir proche, on peut visualiser ce que serait l'organisation d'un laboratoire totalement automatisé dans lequel toutes les tâches techniques intermédiaires sont prises en charge par les appareils et seules les missions d'expertise restent à la charge des techniciens et des biologistes. Quelles sont les tâches qui restent du domaine du technicien microbiologiste ? L'appareil présente à l'écran les cultures bactériennes que le technicien devra analyser afin de choisir les colonies bactériennes qui lui paraissent utiles à étudier. Il doit donc rester un expert dans cette discipline car à ce jour la machine ne peut répondre à la place de l'homme. En collaboration avec le technicien, le biologiste doit être capable d'analyser ces cultures bactériennes pour donner un avis éclairé sur la question. La validation pourra se faire en appelant tous les examens d'un même patient à l'écran (boîtes de culture, antibiogrammes gram...). Cette organisation facilitera le dialogue clinico biologique tout en étant techniquement très performant. Il donnera au technicien et au biologiste un intérêt majeur en lui permettant de gérer la totalité du dossier patient. [20]

Une évolution ultérieure pourrait avoir un impact très important sur le fonctionnement de la microbiologie. Il s'agit de la bactériologie délocalisée. Aujourd'hui celle-ci n'existe pas officiellement pour notre discipline. Elle se développe de plus en plus dans d'autres disciplines (tests biochimiques, gaz du sang...). Les cliniciens en sont friands et cela nous rappelle les laboratoires de service des années antérieures à la création des laboratoires centraux. Dans le domaine de l'infectieux, on peut citer le « doctor test » et la recherche de streptocoques du groupe A dans la gorge, les anticorps antitétaniques aux urgences. On peut facilement imaginer la recherche de streptocoques du groupe B en maternité, la recherche des bactéries multirésistantes dans les services concernés etc. Avec l'explosion de la biologie moléculaire dans le domaine de l'infectieux, certains appareils de biologie moléculaire de maniement très simple sont déjà convoités par les cliniciens pour obtenir un résultat d'identification bactérienne directement à partir d'un prélèvement [21]. Certains laboratoires ont déjà mis en place des laboratoires d'urgence intitulés « point of care lab. » (POC-lab) [22,23,24]. Ces tests POC sont déjà disponibles sur le marché et simples d'emploi. Ils permettent par le biais de tests simples de biologie moléculaire d'obtenir une identification de bactéries ou encore d'obtenir des informations sur certaines résistances bactériennes directement à partir des prélèvements. Cela ne dispense pas de la bactériologie classique qui permet contrairement à ces techniques, l'isolement de la bactérie et l'obtention d'un antibiogramme. Le bactériologiste reste responsable de cette technique y compris dans le cas où celle-ci serait délocalisée. Dans ce dernier cas le biologiste devrait vérifier régulièrement les contrôles et la bonne marche de l'appareil. Jusqu'à ce jour en France, cette tâche n'est pas déléguée aux cliniciens... Parallèlement à cette évolution, les outils informatiques doivent également progresser. Ainsi la bactériologie sans papier doit s'instaurer dans les laboratoires et chaque biologiste doit pouvoir bénéficier d'une tablette tactile comme outil de travail, lui permettant l'accès à distance des logiciels du laboratoire (SGL et également accès à l'imagerie des boîtes de pétri, des antibiogrammes et des Gram). Dans ces conditions on imagine bien le travail de notre futur bactériologiste qui s'apparentera à un membre d'une équipe mobile de bactériologie, circulant de service en service afin de contrôler les appareils qui sont sous sa responsabilité et discuter tablette en main des dossiers des patients avec les cliniciens concernés.

Dans le secteur de la biologie privée qui se regroupe de plus en plus pour former de grands laboratoires pour plus d'efficacité technique et économique, l'intégration des techniques de bactériologie automatisée au cœur d'un laboratoire central ne doit pas empêcher le maintien de la spécialité de microbiologiste et son expertise auprès des cliniciens. La difficulté ici réside plus dans la partie technique avec l'emploi de techniciens souvent polyvalents sur l'ensemble des automates disponibles du laboratoire et présentant de fait un manque d'expertise pour la partie spécifiquement microbiologique. Van Eldere décrit cette organisation de laboratoire dans un CHU de Belgique et montre que les microbiologistes représentant 5 % de l'activité économique ne se retrouvent pas dans ce modèle dans lequel ils considèrent qu'ils n'ont aucune reconnaissance et que leur influence s'est considérablement réduite. [22]

La crainte est donc réelle de voir disparaître la spécificité microbiologique dans un tel contexte.

4. Aspects psychosociologique et économique de cette évolution

La bactériologie a été longtemps une discipline exclusivement manuelle et artisanale. Le temps où nous fabriquions nous-même nos propres milieux n'est pas si loin. Les professionnels de cette discipline ont souvent utilisé cet aspect de la microbiologie pour en tirer une certaine fierté et en faire un art, une excellence dans le domaine de la biologie, particulièrement en France. La technologie et la culture de la qualité en milieu industriel nous ont rattrapés : la performance et l'efficacité économique sont devenues les maîtres mots de notre société. Les changements que cela entraîne dans les laboratoires de bactériologie heurtent les professionnels les plus accrochés aux valeurs Pastoriennes. Il est un fait qu'en acceptant l'automatisation, il faut faire le deuil de la bactériologie à la « Sherlock Holmes » qui nous forçait à rechercher le moindre test permettant d'arriver à une identification bactérienne délicate. Aujourd'hui le spectromètre de masse et la biologie moléculaire nous donnent des réponses très rapides et nous évitent parfois des journées d'errance et de réflexions quant au nom à donner à une bactérie d'identification difficile. De même, les logiciels d'interprétation des antibiogrammes introduits déjà depuis des années nous ont facilité la vie mais ont fait reculer les connaissances de base de cette analyse autrefois uniquement réalisée et interprétée par l'homme : cela représente la contrepartie de cette facilitation. La formation des nouveaux biologistes change aujourd'hui pour s'éloigner de la technique et se recentrer sur la validation des examens automatisés. Cette éducation Pastorienne qui consistait rechercher étape après étape les caractères d'une identification ou d'une résistance bactérienne aux antibiotiques doit se transformer. Nos nouveaux biologistes s'orienteront vers la prise en charge des automates, la gestion des logiciels et le management de la qualité. La partie manuelle du travail devient une option « dégradée » de notre activité. Ces changements sont particulièrement sensibles chez nos jeunes professionnels et pose l'éternel problème de la confrontation des « anciens et des modernes ». Les biologistes comme les techniciens les plus anciens ont acquis leur expérience sur un apprentissage Pastorien. Comme toute évolution, il existe un bénéfice à cette évolution mais il faut savoir faire le deuil de ce que l'on laisse derrière soi. Le changement est en marche et rien ne saurait l'arrêter. Il faut donc que celui-ci s'opère au niveau des équipes et c'est au leader de l'équipe de bien faire comprendre les enjeux de ce changement. Le dialogue, la motivation, la formation et l'information sont autant d'éléments primordiaux pour réussir une transformation parfois difficile à admettre pour une équipe [25]. Ledebor et Dallas [26] reprennent dans un article récent les éléments de controverse, pour ou contre l'automatisation. Pour Dallas, ces appareils d'automatisation de la bactériologie sont chers volumineux et ne pourront pas être économiquement rentables, comme peuvent l'être les automates de biochimie. Les bactériologistes expérimentés

risquent de se retrouver de moins en moins nombreux et de se perdre dans la masse de l'ensemble des examens, comme l'a bien décrit van Eldere [27].

4.1. Quelle place doit donc prendre le technicien dans une structure microbiologique totalement automatisée ?

Le technicien de bactériologie vit jusqu'à maintenant un apprentissage long et difficile. Il faut entre 1 et 2 ans d'expérience pour qu'un technicien se sente à l'aise avec les techniques de bactériologie et l'expertise dans le domaine du diagnostic et de l'identification bactérienne. L'automatisation peut donc être vécue comme une frustration car on assimile le fonctionnement humain au fonctionnement d'une machine. D'un autre côté, la machine évite à l'homme les tâches fastidieuses (ensemencement à la chaîne, manutention lourde...) De fait le système devient plus performant, standardisé et reproductible, tracé et rapide. Le rôle du technicien est donc de sans aucun doute de contrôler ces machines et leur bon fonctionnement. Toutefois, la bactériologie reste un domaine complexe parce qu'il s'adresse au vivant : il fait l'expertise de flores bactériennes diversifiées, il fait face à la variété et à l'adaptabilité des bactéries en fonction de leur environnement et de fait, cette expertise reste le domaine des bactériologistes expérimentés et non celle des machines. On ne peut nier le fait qu'une partie de la technique étant prise en charge par les machines, le nombre de techniciens spécialisés en bactériologie sera réduit pour faire place à des techniciens plus spécialisés dans le domaine de l'ingénierie, l'informatique ou la qualité.

4.2. Quelle place pour le bactériologiste ?

La qualification requise pour être bactériologiste est longue et a été longtemps basée sur l'apprentissage des techniques manuelles utilisées dans un laboratoire de diagnostic. Le rôle du bactériologiste est un rôle d'expertise. Lorsque ce rôle d'expertise se fait sur la base d'une activité manuelle réalisée par le technicien, il semble logique que le biologiste sache également réaliser ces actes vis-à-vis de son équipe. Doit-on continuer à former des biologistes autour de techniques dites « dégradées » alors que ces techniques sont réalisées par des machines (ensemencement, GRAM, cytologie, identification...). C'est la question que se posent nos jeunes professionnels aujourd'hui. Plus que jamais le dialogue autour de ces questions doit s'établir entre jeunes internes et biologistes expérimentés. Nous devons recentrer les objectifs de notre profession face à l'évolution importante qui est en marche.

4.3. Le biologiste doit avant tout savoir répondre aux questions suivantes :

- S'agit-il d'une infection ?
- Quel est le rôle de la (es) bactérie(s) identifiée(s) ?
- Les arguments microbiologiques sont-ils suffisants pour envisager un traitement ? Quels sont les risques encourus sur le plan clinique et épidémiologique ?
- Quels antibiotiques ? Quels risques relatifs à la résistance bactérienne

Les réponses à ces questions doivent être rendues dans les délais les plus courts. Le rôle du biologiste dans son laboratoire est donc d'être le garant de la fiabilité technique du laboratoire, d'avoir une culture qualité et être conforme au COFRAC selon la norme 15189, d'assurer la rapidité de rendu des résultats tout en garantissant leur fiabilité dans un objectif de bénéfice au patient. Il assure conjointement avec le technicien l'expertise des cultures microbiologiques des prélèvements des patients. Les outils mis à disposition du biologiste doivent lui permettre d'élargir son champ d'expertise dans le domaine de la pathologie infectieuse et du conseil microbiologique auprès de ses collègues cliniciens.

5. Impact médical de cette évolution

Le bactériologiste doit être présent dans la sphère clinique pour discuter des résultats des cultures microbiologiques et des antibiogrammes. Certaines études ont montré que les médecins ne prenaient pas suffisamment en considération les comptes rendus de bactériologie. Dans l'étude de van Eldere [16], 50 % des cliniciens ne prennent pas en compte les résultats de bactériologie parce que leur rendu est trop long. Il est donc important d'améliorer la rapidité et la réactivité du rendu d'examens fiables et de maintenir le contact avec les cliniciens. Le choix du fonctionnement 24/24 au laboratoire est une option pour la rapidité. Cependant cette organisation est dangereuse pour le laboratoire car elle induit une dérive de sur-prescription qui doit absolument être régulée par le microbiologiste grâce à un contact permanent avec le clinicien. De fait, le choix d'avoir un bactériologiste mobile qui se déplace dans les services avec un outil performant (tablette informatique) lui permettant d'être en liaison image avec le laboratoire est une option importante pour la prise en compte de l'information et la sensibilisation du clinicien aux résultats et à la prescription des examens bactériologiques. L'informatique, outils précieux pour la diffusion de l'information n'a pas aidé à faire sortir les biologistes de leur laboratoire en mettant les résultats à disposition des cliniciens par l'intermédiaire des serveurs de laboratoire. Nous avons également observé dans notre CHU que la mise à disposition des serveurs de résultats n'avait amélioré que partiellement la rapidité de rendu. La consultation des résultats par les cliniciens au fur et à mesure de leur mise en ligne n'est pas systématique. Enfin la délocalisation de certains appareils à disposition des cliniciens avec une validation sur place du biologiste est une troisième option qui commence à émerger. Cet aspect des choses nécessite une modification de la culture « laboratoire central » et de l'action à distance des bactériologistes. Certains auteurs pensent que les microbiologistes cliniques devraient faire un peu moins de microbiologie et un peu plus de management de pathologie infectieuse. [24, 25]. Dans ces conditions, les résultats de microbiologie auraient un impact beaucoup plus important sur la prise en charge des patients.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Lamy B. Automates pour hémoculture an 2005. Biotribune magazine 2005; 16 (1):35-40.
- [2] Bernier M, Catelain F, Philippon A. Place des nouveaux automates dans un laboratoire de bactériologie. Rev Franc Lab 2001; 335:49-56.
- [3] Marcel JP. L'automation en bactériologie: son impact médical. Antibiotique 2006; 8: 162-165.
- [4] Croize J, Recule C, Pelloux I, Chantepedrix V, Maurin M. L'automatisation en bactériologie: un challenge continu. L'expérience du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Spectra Biologie 2007; 160:4551.
- [5] Bourbeau P P, Ledebøer N A. Automation in Clinical Laboratory. J Clin Microbiol 2013; 51 (6): 1658-1665.
- [6] Mutters N T. Laboratory Automation in Clinical Microbiology: a Quiet Revolution. Austin J Infect Dis 2014; 1(1): 2
- [7] BioMerieux diagnostic: www.biomerieux.com.cn/upload/ApiGallery.pdf.
- [8] Lamy B; Automates pour hémocultures en 2005; Biotribunen Magazine 2005; 16:35-40
- [9] Bourbeau P P, Swartz B L. First Evaluation of the Wasp, a New automated Microbiology Plating Instrument. J Clin Microbiol 2009; 47: 1101-1106
- [10] Greub G. Automatisation en Microbiologie Diagnostique. Swiss Laboratory medicine 2013;5: 9-11
- [11] Novak S M, Marlow E M. Automation in the Clinical Microbiology Laboratory. Cli Lab Med 2013; 33: 567-588.
- [12] Seng P, Drancourt M, Gouriet F et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted laser Desorption ionization Time of Flight mass Spectrometry. Clin Infect Dis 2009;49: 543-551.
- [13] Mutters N T, Hodiamont C J, Menno D de Jong MD et al. Performance of Kiestra total Laboratory automation combined with MS in clinical microbiology practice. Ann Lab Med 2014; 34:111-117.
- [14] Humphreys H, Nagy E, Kahlmeter G, Ruijs GJ. The need for European Professional Standards and the Challenges Facing Clinical Microbiology. Eur J Clin Microbiol infect Dis 2010; 29: 617-621.
- [15] Doern G V, Scott D R, Rashad A L. Clinical impact of rapid antimicrobial susceptibility testing of blood culture isolates; Antimicrob Agents Chemother 1982;21: 1023-1024.
- [16] van Eldere J. Models for change in clinical microbiology; Clin Microbiol Infect 2000; 6: 445-448.
- [17] Camporese A. The impact of automation on organizational Changes in a Community Hospital Clinical Microbiology Laboratory. Infez Med 2004; 2: 118-125
- [18] Eveillard M, Lemarié C, Cottin J, Hitoto H, Mahaza C, Kempf M, Joly-Guillou ML. Assessment of the usefulness of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing 24 h a day in a clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. 2010 Aug;16(8):1084-9.
- [19] Pailhoriès H, Lemarié C, Kouatchet A, Lasocki S, Sargentini C, Kempf M, Coron N, Mahaza C, Joly-Guillou ML, Eveillard M. The impact of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing on bronchoalveolar fluid cultures 24 h a day in a microbiology laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Nov;80(3):216-21.
- [20] Van Belkhum A; Durand G, Peyret M et al. Rapid Clinical Bacteriology and its Future Impact. Ann Lab Med 2013; 33: 14-27.
- [21] Buchan B W, Ledebøer N A. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology laboratory. Clin Med Rev 2014; 4: 783-822.
- [22] Gouriet F, Raoult D. Diagnostic Microbiologique: du diagnostic par étiologie au diagnostic par syndrome. Antibiotique 2009; 11: 37-48.
- [23] Clerc O, Greub G. Routine use of point-of-care tests: usefulness and application in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1054-1061
- [24] Cohen-Bacrie S, Ninove L, Nougairède A et al. Revolutionizing Clinical Microbiology Laboratory Organization in Hospitals with *in situ* Point of Care. PloS One 2011;6: 1-7
- [25] Diquemare D. la résistance au changement, produit d'un système et d'un individu. Les Cahiers de l'actif 2015;N°292/293:81-96.
- [26] Ledebøer N A, Dallas S D. the automated Clinical Microbiology laboratory: Fact or Fantasy ? Point and counterpoint. J Clin Microbiol 2014;52: 3143-3146
- [27] van Eldere J. Changing needs, opportunities and constraints for the 21st century microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 15-18.
- [28] Scott G M Clinical Microbiology – The UK model. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 402-404

QCM Évaluez-vous !

*Ceci est un questionnaire à choix multiples.
Par conséquent, il est possible que certaines questions
puissent bénéficier de plusieurs réponses possibles.
Dans ce cas, il s'agit de les cocher toutes.*

1 Parmi ces affirmations concernant l'automate UF-1000i® (SYSMEX), la(les)quelle(s) est (sont) vraie(s) ?

- ☐ A. Le principe analytique de cet automate est basé sur la fluorocytométrie en flux
- ☐ B. La focalisation hydrodynamique à l'aide du liquide de gainage (UF-Sheath) permet une unicité de passage et de lecture de chaque particule devant le faisceau laser
- ☐ C. L'intensité de la lumière diffusée vers l'avant (*Fsc*: *Forward Scatter*) reflète le diamètre de la cellule ou particule analysée
- ☐ D. Plus l'index de lumière latérale (*Ssc*: *Side scatter*) est faible, plus la structure interne de la cellule analysée est complexe
- ☐ E. La lumière fluorescente émise par les cellules urinaires colorées (*Fisc*) reflète la richesse cellulaire en acides nucléiques

2 Une leucocyturie aseptique peut être associée à :

- ☐ A. Une polykystose rénale
- ☐ B. Une endométriose
- ☐ C. Une tumeur urothéliale
- ☐ D. Une néphropathie interstitielle chronique
- ☐ E. Une infection urinaire décapitée

3 Parmi ces affirmations concernant l'automate SediMAX® (MENARINI Diagnostics), la(les)quelle(s) est (sont) vraie(s) ?

- ☐ A. Son principe analytique repose sur la microscopie urinaire couplée à une imagerie numérique
- ☐ B. Son principe analytique est basé sur une microscopie automatique du culot de centrifugation urinaire
- ☐ C. Les volumes d'échantillon minimal et analytique sont respectivement de 4 ml et de 1,2 ml
- ☐ D. Sa cadence d'activité est de 60 à 80 échantillons urinaires traités par heure
- ☐ E. Son seul consommable est la cuvette à usage unique

4 Quelles sont les principales applications de la biologie moléculaire au laboratoire de microbiologie :

- ☐ A. Détermination de la résistance aux antibiotiques
- ☐ B. Détection de bactéries peu ou pas cultivables
- ☐ C. Risque nosocomial, et transmission interhumaine

- ☐ D. Diagnostic d'infections bactériennes respiratoires basses (hors tuberculose)
- ☐ E. Diagnostic de méningites à herpès virus
- ☐ F. Aucune de ces affirmations

5 Que faut-il préconiser comme technique d'amplification génique en 2016, sous réserve du marquage CE des réactifs :

- ☐ A. L'amplification génique « maison »
- ☐ B. L'amplification génique commerciale
- ☐ C. L'amplification génique en temps réel maison
- ☐ D. L'amplification génique en temps réel commerciale
- ☐ E. Aucune de ces affirmations

6 Est-ce que l'automatisation en microbiologie est, en 2016 :

- ☐ A. Bien réelle et efficace
- ☐ B. Nécessite encore des améliorations
- ☐ C. La microbiologie reste et restera une discipline manuelle
- ☐ D. Aucune de ces affirmations

7 L'identification par spectrométrie Maldi-Tof est basée sur :

- ☐ A. L'analyse des protéines à activité enzymatique fermentative
- ☐ B. L'analyse des constituants de la paroi bactérienne
- ☐ C. L'analyse des protéines majoritairement ribosomales
- ☐ D. La séparation des protéines en fonction de leur charge
- ☐ E. La séparation des protéines en fonction de leur masse

8 La spectrométrie de masse à des difficultés pour séparer ces espèces :

- ☐ A. *Bacillus cereus* et *B. anthracis*
- ☐ B. *Corynebacterium diphtheriae* et *C. pseudodiphtheriticum*
- ☐ C. *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus lactis*
- ☐ D. *Streptococcus pneumoniae* et *S. mitis*
- ☐ E. *Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae*

9 les avantages des automates d'identification biochimique sont:

- ☐ A. Le résultat est obtenu en moins d'une heure
- ☐ B. Ils peuvent permettre de séparer des taxons phylogénétiquement proches
- ☐ C. Contrairement à la spectrométrie Maldi-Tof, ils sont connectables au SIL
- ☐ D. Ils peuvent être couplés avec l'antibiogramme

10 Parmi les dispositifs suivants, quels sont les lecteurs automatiques de l'antibiogramme par diffusion actuellement commercialisés en France ?

- ☐ A. Prelud
- ☐ B. SirScan
- ☐ C. Osiris
- ☐ D. Biomic
- ☐ E. Adagio

11 Quel est le principe de la détermination de la CMI dans les systèmes (semi)automatisés cités ci-dessous ?

- ☐ A. Phoenix : CMI lue d'après la croissance bactérienne mesurée par colorimétrie
- ☐ B. Microplaques Sensititre : CMI lue d'après la croissance bactérienne mesurée par fluorométrie
- ☐ C. Vitek 2 : CMI calculée d'après un algorithme basé sur la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique
- ☐ D. Microscan WalkAway : CMI lue d'après la croissance bactérienne mesurée par turbidimétrie
- ☐ E. Vitek 2 : CMI lue d'après la croissance bactérienne mesurée par colorimétrie

12 Dans la liste suivante, quels sont les critères de performances officiellement requis pour les méthodes automatisées d'antibiogramme ?

- ☐ A. « Essential Agreement » $\geq 95 \%$
- ☐ B. « Categorical Agreement » $\geq 90 \%$
- ☐ C. « Very Major Discrepancies » $\leq 3 \%$
- ☐ D. « Major Discrepancies » $\leq 5 \%$
- ☐ E. « Minor Discrepancies » $\leq 7 \%$

13 Parmi les propositions suivantes quelle est celle qui est fausse. La chaîne d'automatisation complète d'un laboratoire de bactériologie

- ☐ A. Élimine la manutention des plateaux de lecture de boîtes de gélose
- ☐ B. Permet de travailler par dossier complet du patient
- ☐ C. Fait l'expertise des boîtes de culture
- ☐ D. Renforce la sécurité du personnel
- ☐ E. Accélère le rendu du résultat au clinicien

14 Quel est l'élément principal qui a permis le développement de l'automatisation en microbiologie ?

- ☐ A. Le développement d'images de très haute résolution
- ☐ B. La disponibilité de milieu de culture chromogènes
- ☐ C. L'avènement des nanotechnologies
- ☐ D. La disponibilité de milieu de transport liquides pour les frottis

15 L'automatisation en bactériologie permet-elle des économies ?

- ☐ A. Non, car les coûts de maintenance et d'achat sont supérieurs aux gains escomptés
- ☐ B. Oui, surtout en raison de gains de réactifs par le nombre réduit de milieu ensemencé
- ☐ C. Oui, surtout par un gain de temps technicien(ne) et à condition d'accompagner l'automatisation par une restructuration des procédures
- ☐ D. Non, le but est uniquement un gain de qualité

16 Quel est l'avantage de la télébactériologie ?

- ☐ A. Sous traiter la lecture des géloses en Chine
- ☐ B. Une bonne préservation de la viabilité des colonies présentes dans l'échantillon grâce à un milieu de culture spécifique
- ☐ C. Travailler dans de bonnes conditions hors des odeurs et de l'agitation du laboratoire
- ☐ D. Superviser le travail et valider les résultats depuis son domicile

RÉPONSES AUX QUESTIONS

Voir en première page de la rubrique
Entreprise Labo, page 82

Un abcès cérébral dû à *Cladophialophora bantiana* en Guyane

Adeline Mallard^a, Adrien Tolle^a, Jérôme Clouzeau^a, Nathalie Parez^a, Faustin Kugbe^a, Patrice Bourée^{b,c}, Corinne Paggi-Josse^a, Serge Zedong^a, Solange Buende^a, Mamay Gaimard^a

1. Introduction

Les champignons noirs (ou dématiés) sont cosmopolites, y compris en France métropolitaine [1] et sont responsables des infections appelées phaéohyphomycoses (du grec *phaios* = foncé). Ces champignons ont une pigmentation noire, du fait de la mélanine contenue dans les membranes de leurs cellules. Les champignons dématiés sont essentiellement des saprophytes retrouvés sur le sol et les végétaux en décomposition, surtout en climat chaud et humide [2]. *Cladophialophora bantiana* (de Hoog et al, 1995), de la famille des hyphomycètes, isolé pour la première fois d'un abcès du cerveau en 1911, est l'espèce la plus souvent isolée dans les cas de phaéohyphomycoses du système nerveux central (48 % dans une série de 101 cas en Inde) [3]. Nous rapportons le cas d'une phaéohyphomycose, chez un jeune patient, sans antécédent, résidant en Guyane.

2. Observation

Un garçon de 8 ans, vivant dans la région d'Apatou, zone rurale de l'ouest de la Guyane, est adressé en pédiatrie pour un syndrome méningé fébrile. Il n'a aucun antécédent médico-chirurgical, en dehors d'une légère contusion crânienne deux mois auparavant, qui n'avait entraîné aucune exploration particulière, l'examen neurologique étant strictement normal.

À l'entrée, l'hémogramme montre une hyperleucocytose à 16 000 leucocytes/mm³, une CRP à 27,3 mg/l et le LCR contient 900 éléments/mm³. La mise en culture du sang et du LCR ne retrouve aucun germe. Les recherches, dans le LCR, du virus herpès par PCR et du cryptocoque sont négatives, ainsi que les sérologies de toxoplasmose et de VIH. Le scanner cérébral met en évidence

Figure 1 – Scanner montrant une dilatation des ventricules.



un œdème temporal gauche avec un rehaussement circulaire. Devant ce tableau d'infection méningée, l'enfant est traité par l'association céfotaxime-vancomycine, avec de l'aciclovir et de la dexaméthasone. Cinq jours après le début du traitement, il présente un épisode d'hypertension intra-crânienne avec des vomissements et une céphalée intense, qui est traitée par mannitol intra-veineux. Un nouveau scanner montre une aggravation des lésions, avec une ventriculite diffuse et une dilatation de tous les ventricules (figure 1), évoquant un obstacle au niveau de l'aqueduc de Sylvius. Une IRM visualise des lésions nodulaires cérébrales multifocales à contenu liquidien, cernées par un œdème périlésionnel évoquant des abcès, ainsi qu'une ventriculite diffuse et une hydrocéphalie.

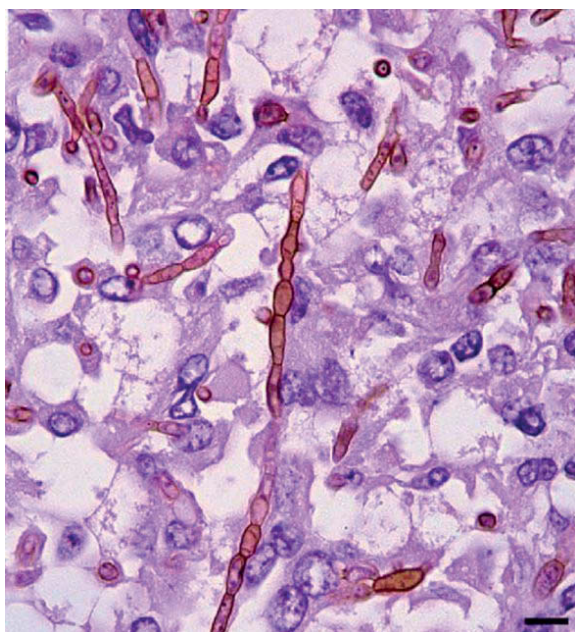
Transféré en neurochirurgie à la Martinique, il subit une résection des lésions avec mise en place d'une dérivation ventriculo-péritonéale. L'analyse du LCR purulent en per-opératoire, révèle la présence de filaments mycéliens septés. La recherche de 1-3 bêta-glucane étant positive, un traitement antifongique est institué (amphotéricine B pendant 1 semaine puis itraconazole et flucytosine pendant 7 semaines). Dix jours plus tard, les cultures du LCR et de la biopsie des abcès cérébraux mettent en évidence un champignon noir identifié comme étant *Cladophialophora bantiana*, la confirmation étant effectuée par biologie moléculaire au centre national de référence des mycoses (Institut Pasteur de Paris).

a Service de Pédiatrie,
Hôpital de l'ouest-guyanais Franck Joly
97320 St-Laurent-du-Maroni
b Centre de santé d'Apatou,
Guyane
c Service de Parasitologie-Mycologie,
Hôpital Cochin, 75014 Paris

Correspondance
mallard.adeline7@gmail.com

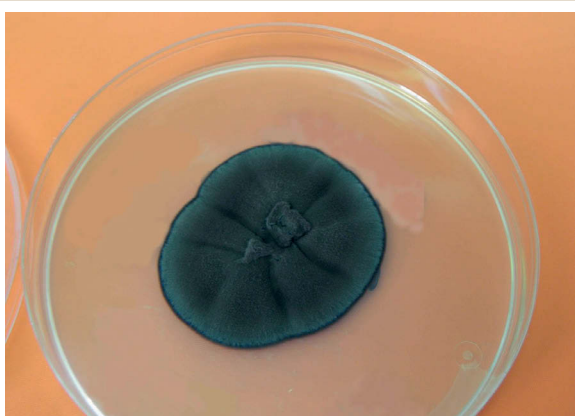
article reçu le 4 novembre 2015, accepté le 11 février 2016
© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 2 – Biopsie avec des filaments mycéliens de *Cladophialophora bantiana*.



Un scanner corps entier, révèle alors la présence de plusieurs lésions secondaires au niveau du muscle psoas droit, ainsi que de multiples lésions pulmonaires et médullaires. Devant ces lésions diffuses, leur exérèse chirurgicale est exclue et l'enfant reste sous antifongiques (amphotéricine B associée à voriconazole puis posaconazole), en récupérant un peu de mobilité. Mais dix mois plus tard, l'enfant présente une occlusion de la dérivation ventriculo-péritonéale, nécessitant une ablation chirurgicale des parties intra-péritonéale et intra-thoracique du cathéter, qui se complique d'une méningite à *Staphylococcus epidermidis*, traitée pendant un mois par céfotaxime et rifampicine. Son état s'améliore doucement, mais il refait un épisode d'obstruction nécessitant un retour en neurochirurgie mais décède rapidement, très probablement par complication de la dérivation ventriculo-péritonéale. Les différentes

Figure 3 – Culture de *Cladophialophora bantiana* (CHUC, Coïmbra, Portugal).



recherches de bêta-glucane sont alors négatives, ainsi que la culture mycologique du sang et du LCR II n'y a pas eu de vérification nécropsique

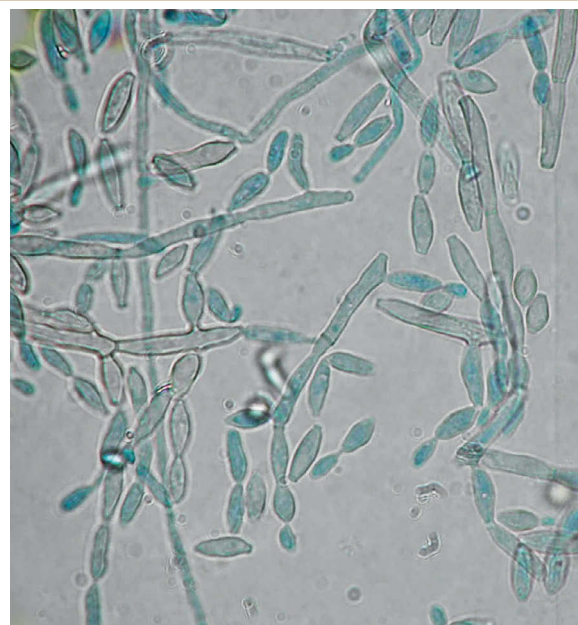
3. Discussion

La Guyane est un département français, en majorité rural, situé en Amérique du Sud, entre le Suriname et le Brésil, avec un climat chaud et humide, habitat idéal pour de nombreux agents pathogènes. *Cladophialophora bantiana*, un des champignons responsables de phaéohyphomycose, atteint l'homme et quelques animaux [4] et est responsable d'infections du système nerveux, en particulier chez les sujets immunodéprimés [5], souvent à la suite d'un traumatisme, même remontant à plusieurs années [6], avec le risque d'une dissémination hémotogène [7]. Les facteurs de risques sont connus (transplantation [8, 9], corticothérapie, diabète [10], toxicomanie, alcoolisme) [11], mais aucun ne correspondait à notre patient. Cependant, plusieurs cas d'infection avec ce champignon ont été constatés chez des sujets immunocompétents, sans facteurs connus de risques [12, 13], comme dans une série en Inde chez des travailleurs agricoles, ayant donc une exposition prolongée à la végétation, ce qui peut être considéré comme un environnement favorable [10]. Dans le cas de notre patient, le traumatisme crânien antérieur, même minime, a pu être une porte d'entrée, avec une dissémination ultérieure. En effet, outre les multiples abcès cérébraux [13], ce champignon peut aussi provoquer une atteinte pulmonaire [14], cutanée [15], intestinale ou encore disséminée [16].

Chez ce patient, ayant consulté pour un syndrome méningé fébrile, il était légitime de commencer un traitement empirique par des antibiotiques, aucun facteur de risque n'ayant permis de s'orienter vers une infection mycologique. Devant des abcès cérébraux ou des nodules cutanés, ni la clinique ni l'exploration radiologique ne permettent d'affirmer une origine mycosique, car seule la biopsie avec l'examen anatomo-pathologique qui montre des filaments mycéliens (figure 2), l'examen direct et la mise en culture du pus sur des milieux de Sabouraud permettent de mettre le champignon en évidence [1, 17]. La culture pousse entre 14 °C et 42 °C pour donner un aspect noir et duveteux (figure 3). L'examen microscopique des cultures montre des filaments septés et pigmentés avec de nombreuses microconidies ovoïdes de 2 à 3 microns (figure 4). En outre, ce champignon est positif avec l'uréase, contrairement aux autres *Cladophialophora*.

Malgré l'absence de risque nosocomial, il est néanmoins préférable d'isoler le patient et d'effectuer les soins avec de grandes précautions d'asepsie [18]. À défaut de consensus thérapeutique [19], le traitement nécessite l'association de l'évacuation chirurgicale des abcès et la prise d'antifongiques (amphotéricine B, itraconazole, voriconazole (malgré l'échec thérapeutique déjà constaté [20], ou posaconazole) [21] pendant plusieurs mois [22, 23], mais l'évolution des atteintes cérébrales est le plus souvent fatale, même avec un traitement précoce [24].

Figure 4 – Filaments de *Cladophialophora bantiana* (CHUC, Coïmbra, Portugal).



Cependant, avec les mêmes protocoles thérapeutiques, les atteintes cutanées ont un meilleur pronostic [25].

4. Conclusion

Ainsi, le diagnostic d'infection à *Cladophialophora bantiana*, la plus sévère des phaeohyphomycoses est difficile à établir en dehors de l'analyse des liquides biologiques concernés et surtout d'une biopsie des lésions. Le pronostic est assez sombre malgré une prise en charge médicale et chirurgicale. Cette observation illustre la difficulté d'évoquer une infection fongique chez un patient immunocompétent, sans facteur de risque connu.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de la Martinique (S. Jacob, C. Moisse) et le Centre National de Référence des Mycoses et Antifongiques (F. Dromer) pour l'identification du champignon et le Dr B. Rozé (service d'inféctiologie, CHU de la Martinique) pour les conseils thérapeutiques.

Références

- [1] Bonnet C, Garcia-Hermoso D, Bertandeau E et coll. Abscès cérébral à *Cladophialophora bantiana*: un cas métropolitain avec survie prolongée. Rev Neurol 2014; 170:140-50
- [2] Ajantha GGS, Kulkarni KD. *Cladophialophora bantiana*, the neurotropic fungus. A minireview. J Clin Diagn Res 2011; 5: 1301-6
- [3] Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis. A review of 101 cases. Clin Inf Dis 2004; 38: 206-16.
- [4] Elies L, Balandraud V, Boulouha L et al. Fatal systemic phaeohyphomycosis in a cat due to *Cladophialophora bantiana*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003 ;50 (1): 50-3
- [5] Roche M, Redmond RM, O'Neill S, Smyth E. A case of multiple cerebral abscesses due to infection with *Cladophialophora bantiana*. J Infect 2005; 51:e-285-8
- [6] Schoeffler A, Redon E, Contet-Audonnet N et coll. Phaeohyphomycose cutanée à *Cladophialophora bantiana*. Ann Derm Vénéréol 2011; 138:504-7
- [7] Nandedkar S, Baipai T, Bhatambare GS, Sakhi P. Cerebral phaeohyphomycosis: a rare case from central India. Asian J Neurosurg 2015; 10:142-4
- [8] Levin TP, Baty DE, Fekete T et al. *Cladophialophora bantiana* brain abscess in a solid-organ transplant recipient: case report and review of the literature. J Clin Microbiol 2004; 42: 4374-8
- [9] Huang WM, Fan YM, Li W, Yang WW. Brain abscess caused by *Cladophialophora bantiana* in China. J Med Microbiol 2011; 60:1872-4
- [10] Baddley JW, Salzman, Pappas PG. Fungal brain abscess in transplant recipients: epidemiologic, microbiologic and clinical features. Clin Transpl 2002; 16: 419-24
- [11] Sladekova J, Poczkova M, Gaspar M et al. First case of systemic phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana* in Slovakia. JMM Case Reports 2014; doi:10.1099/jmmcr.0.002659
- [12] Deb S, Khan AK, Debasish B, Subroto B. Intracranial necrotizing granuloma caused by *Cladophialophora bantiana*. Neurol India. 2005 Sep;53(3):335-6.
- [13] Suri P, Chhina DK, Kaushal V et al. Cerebral phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. A case report and review of literature from India. J Clin Diagn Res 2014; Apr 8:DD01-5; doi :10.7860
- [14] Mansour A, Jordan K. Disseminated *Cladophialophora bantiana* disease in a patient with prediabetes. BMJ Case Rep 2014; nov 14; doi:10.1136/bcr-2014-206426
- [15] Neoh CY, Tan SH, Perera P. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana* in an immunocompetent patient. Clin Exp Dermatol 2007; 32:539-40
- [16] Keyser A, Schmid FX, Linde HJ et al. Disseminated *Cladophialophora bantiana* infection in a heart transplant recipient. J Heart Lung Transplant. 2002 21(4):503-5
- [17] Chabasse D, Brun S. Phaeohyphomycoses. Enc Med Chir, Biol Med 2003, 90-350035
- [18] Saegeman V, Bammens B, De Munter P et al. How to isolate a patient with *Cladophialophora bantiana* infection? An opinion. Jour Hosp Infect 2015; 91 : 87-92
- [19] Chakrabarti A, Kaur H, Rudramurthy SM et al. Brain abscess due to *Cladophialophora bantiana*: a review of 124 cases. Med Mycol 2016; 54: 111-9
- [20] Fica A, Diaz MC, Luppi M et al. Unsuccessful treatment with voriconazole of a brain abscess due to *Cladophialophora bantiana* 2003;35 : 892-3
- [21] Borkar SA, Sharma MS, Rajpal G et al. Brain abscess caused by *Cladophialophora bantiana* in an immunocompetent host: need for a novel cost-effective antifungal agent. Ind Jour Med Microbiol 2008; 26: 271-4
- [22] Garzoni C, Markham L, Bijlenga P, Garbino J. *Cladophialophora bantiana* : a rare cause of fungal brain abscess. Clinical aspects and new therapeutic options. Med Mycol 2008; 45: 481-6
- [23] Li DM, de Hoog GS. Cerebral phaeohyphomycosis- a cure at what lengths? Lancet Infect Dis 2009; 9: 376-83
- [24] Khetan SP, Agrawal VA, Qazi MS. Cerebral phaeohyphomycosis - could early diagnosis have saved the patient? Ind Journ Med Microbiol 2014; 32:440-2
- [25] Khader A, Ambooken B, Binitha MP et al., Disseminated cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. Ind J Dermatol Venerol Leprol 2015; 81: 491-4

DESRIPTIF

Un prélèvement cutané est reçu à votre Laboratoire pour identification d'un parasite (*figure 1*). La demande émane d'un dermatologue : « lésion de la plante du pied gauche constituée d'une croûte noire cernée d'un halo blanc apparemment purulent. Détachement de la croûte avec une lame n° 15, découverte d'une collection de forme conique (comme un essaim d'abeilles), accrochée sous la croûte, constituée de micro vésicules blanches qui semblent être de nature parasitaire ». Le patient est un homme de 46 ans.

Vous mettez le prélèvement sur une lame (*figure 2*).



Figure 1. Prélèvement cutané adressé au laboratoire (sérum physiologique).

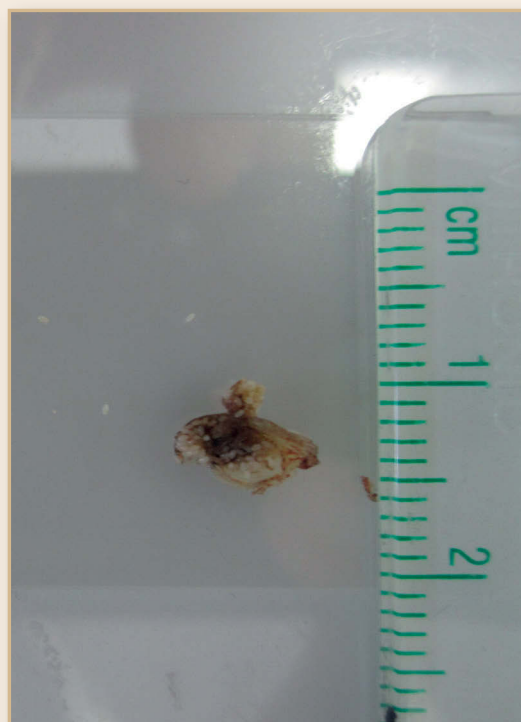


Figure 2. Prélèvement disposé sur une lame.

QUESTIONS

1. À quoi correspondent les microvésicules blanches observées par le dermatologue ?
2. Comment confirmer votre hypothèse ?
3. Quel est votre diagnostic ?

RÉPONSES AU VERSO



a Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Hôpitaux Paris Centre, Faculté Paris Descartes
Université Paris Sorbonne, AP-HP
Hôpital Cochin
27, rue du Fbg St-Jacques - 75014 Paris

Correspondance
andre.paugam@aphp.fr

André Paugam^a (MD, PhD)
Frédéric Arieu^a (MD, PhD).

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

RÉPONSES

R1 Ce sont des œufs. Un examen microscopique au faible grossissement (**figure 3**) permet de confirmer formellement cette hypothèse : œufs ovoïdes (300 x 600 µ).

Figure 3. Examen microscopique (x 10) des « micro vésicules ».



R2 Vous téléphonez au dermatologue pour avoir des précisions sur le contexte: il vous apprend que la lésion est apparue 2 semaines après un séjour touristique en Éthiopie. Le patient se plaignant d'un suintement local. Il vous adresse une photo de la lésion avant prélèvement (**figure 4**).

Figure 4. Plante du pied gauche avant le prélèvement.



R3 Il s'agit d'une tungose parasitose due à *Tunga penetrans* appelée aussi puce chique. Ce petit parasite de 1 mm de long (**figure 5**) est fréquent en zone tropicale. On l'observe couramment en Amérique du Sud et Amérique centrale, aux Caraïbes (Haïti, Trinidad) mais pas aux Antilles françaises, en Afrique sub-saharienne, dans l'Océan Indien (Madagascar, Seychelles), plus rarement en Indes et au Pakistan. Les puces sont présentes dans les sols meubles. Le réservoir animal est constitué de chiens et chats errants, de porcs et de rongeurs. La femelle gravide infecte ces animaux ou l'homme par voie transcutanée, le plus souvent au niveau des membres inférieurs. Après la pénétration du parasite la puce se gorge de sang, elle grossit, une tuméfaction d'un demi-centimètre, souvent prurigineuse, peu douloureuse, arrondie se constitue. C'est un nodule clair au centre duquel on observe une tache sombre, la lésion est dite en « boule de gui », « œil-de-perdrix ». Le centre de la lésion, brun, noir, correspond à l'abouchement de la partie postérieure de l'abdomen de la puce à l'épiderme (**figure 6**). En moins d'une semaine les œufs sont matures et peuvent être expulsés. Les larves issues des œufs se transformeront en adultes en une quinzaine de jours.

Tunga penetrans ne transmet aucun virus ou bactérie. Une fois la puce extraite à l'aide d'un vaccinostyle ou d'une curette (pas de saignement), il ne reste qu'un cratère propre qui ne nécessite qu'une asepsie locale jusqu'à cicatrisation. Une séro-anatoxinothérapie antitétanique systématique est conseillée. En cas d'infections multiples l'ivermectine peut être proposée.



Figure 5. *Tunga penetrans* femelle (CD rom Anofel 4).



Figure 6. Lésion cutanée typique en boule de gui (CD rom Anofel 4).

Bibliographie

[1] Palicelli A, Boldorini R, Campisi P et al. Tungiasis in Italy: an imported case of *Tunga penetrans* and review of the literature. Pathology – Research and Practice 2016 (article in Press).

[2] Guiguen C. Puce chique ou tungose. In Gentilini M. Médecine Tropicale. Lavoisier, Médecine Sciences Publications, 2012, page 420.

[3] Lefebvre M, Capito C, Durant C et al. La tungose: une dermatose tropicale peu connue. Médecine et Maladies Infectieuses 2011; 41: 465-468.

[4] Degeilh B, Beaucornu JC. Parasitoses et mycoses courantes de la peau et des phanères. In Chabasse D et Caumes E, coordonateurs. Elsevier Masson, 2003, pages 55 à 61.

DROIT DES CONTRATS

Ordonnance réformant le droit des contrats

Après un an de consultation, le Gouvernement a publié l'ordonnance réécrivant les dispositions du Code civil relatives au droit des contrats, au régime général et à la preuve des obligations. Les nouvelles mesures s'appliqueront aux contrats conclus à compter du 1^{er} octobre prochain.

L'article 8 de la loi 2015-177 du 16 février 2015 relative à la modernisation et à la simplification du droit a donné un an au Gouvernement pour modifier, par voie d'ordonnance, le livre III du Code civil, afin de « moderniser, de simplifier, d'améliorer la lisibilité, de renforcer l'accessibilité du droit commun des contrats, du régime des obligations et du droit de la preuve, de garantir la sécurité juridique et l'efficacité de la norme ».

Après qu'un projet d'ordonnance ait été rendu public le 25 février 2015 et soumis à consultation, l'ordonnance 2016-131 du 10 février 2016 « portant réforme du droit des contrats, du régime général et de la preuve des obligations » a finalement été publiée*. Ce texte renumérote un pan entier du Code civil.

Le droit des obligations est une matière fondamentale : c'est le socle commun des échanges entre patrimoines, par les contrats, mais aussi de la réparation des dommages, par le droit de la responsabilité.

Généralement étudié à l'université durant deux semestres (un semestre consacré au droit des contrats, l'autre à la responsabilité et au régime général des obligations), le cours de droit des obligations est fondamental en droit privé, car les contrats constituent, avec la loi, l'une des sources principales de droit. Les notions abordées sont valables pour toutes les disciplines du droit, publiques et privées, sous réserve de particularités.

En effet, le droit des obligations est une matière essentielle à la compréhension de l'ensemble du droit civil. Les notions fondamentales peuvent être regroupées en trois axes :

- Le premier est celui de la **formation du contrat**. Pour être valablement formé, le contrat doit respecter des conditions de fond (consentement, capacité, cause et objet) et, parfois, de forme. Si ces conditions ne sont pas satisfaites, le contrat encourt l'annulation.
- Le deuxième est celui de l'**exécution du contrat**. Le contrat a un effet obligatoire pour les parties et un effet relatif à l'égard

des tiers. L'un et l'autre de ces effets subissent néanmoins de profondes atténuations. Si le contrat n'est pas correctement exécuté, le créancier peut recourir à différents moyens afin d'obtenir la satisfaction de laquelle il a été privé.

- Le troisième est celui de l'**extinction du contrat**. Sans nous attarder sur l'annulation ou la résolution, seront ici évoqués les différents modes d'extinction du contrat. Le contrat peut en effet s'éteindre à la suite d'un paiement ou par d'autres moyens.

La sécurité juridique

Par ailleurs, le premier objectif poursuivi par l'ordonnance est celui de la sécurité juridique. En effet, l'ordonnance rend les textes du Code civil plus accessibles par l'utilisation d'un langage actuel et de notions modernes. C'est ainsi par exemple que l'**acte « sous seing privé »** devient l'**acte « sous signature privée »**.

Par ailleurs, certaines notions relatives à la définition du contrat ont disparu, comme la notion de « **faire, de ne pas faire et de donner** ». *A contrario*, certaines définitions font leur apparition dans la nouvelle version du Code civil, permettant la codification de notions jurisprudentielles, comme par exemple l'**offre ou la promesse unilatérale**.

Enfin, l'ordonnance met fin à certaines hésitations jurisprudentielles et prend position, notamment s'agissant de **la date à laquelle se forme le contrat**.

Renforcer l'attractivité du droit français, sur le plan politique, culturel et économique

Le second objectif poursuivi par l'ordonnance est, selon les termes du rapport « *de renforcer l'attractivité du droit français, sur le plan politique, culturel et économique* ». Cet objectif est fondé sur le constat que le droit français n'est pas utilisé autant qu'il pourrait l'être. L'abandon de la notion

RÉPONSES AUX QUESTIONS DU QCM

(pages 74-75)

- | | | |
|------------------|---------------|-------|
| 1. A, B, C, E | 7. C, E | 13. C |
| 2. C, D, E | 8. A, C, D, E | 14. D |
| 3. B, D, E | 9. C, E | 15. C |
| 4. A, B, C, E | 10. B, E | 16. C |
| 5. A, B, C, D, F | 11. A, C, D | |
| 6. B | 12. B, C | |

de cause dans le Code civil 2016 en est un exemple parlant. Cette notion était difficile à appréhender pour l'ensemble des professionnels et praticiens étrangers. En effet, cette notion est absente de la plupart des droits étrangers. Sa suppression pourra permettre au droit français de reprendre une place de premier choix lorsqu'il s'agira de déterminer par quel droit est régi tel ou tel contrat international. Enfin, l'ordonnance propose de « consacrer certains mécanismes juridiques issus de la pratique, en leur conférant un régime juridique précis et cohérent, tel que la cession de contrat ».

Les nouveautés de cette réforme

À titre non exhaustif, voici quelques nouveautés du Code civil version 2016 concernant la formation du contrat, son exécution et son extinction.

La définition du contrat, toujours à l'article 1101 du Code civil, prévoit désormais que : « *Le contrat est un accord de volontés entre deux ou plusieurs personnes destinées à créer, modifier, transmettre ou éteindre des obligations* ».

Les notions de « *donner, faire ou ne pas faire* » ont disparu de la définition du contrat.

Comme évoqué, une autre nouveauté est à souligner, la **disparition de la notion de cause**. En effet, facteur d'insécurité juridique selon la doctrine et la pratique, la nouvelle rédaction de l'article portant sur les conditions de validité du contrat ne fait plus état de la notion de cause. Le nouvel article 1128 remplaçant l'article 1108, prévoit :

« *Sont nécessaires à la validité d'un contrat :*

- 1° *Le consentement des parties ;*
- 2° *Leur capacité de contracter ;*
- 3° *Un contenu licite et certain ».*

Les notions d'**offre** et d'**acceptation**, autrefois uniquement jurisprudentielles ont désormais une sous-section entière à leurs noms. Ces deux notions sont définies, leurs conditions posées et leurs sanctions énoncées. L'article 1113 énonce : « *Le contrat est formé par la rencontre d'une offre et d'une acceptation par lesquelles les parties manifestent leur volonté de s'engager. Cette volonté peut résulter d'une déclaration ou d'un comportement non équivoque de son auteur* ».



© 4zevar/fotolia.com

Concernant les contrats préparatoires, sont consacrées les notions jurisprudentielles de **pacte de préférence** et de **promesse unilatérale** qui font l'objet de deux articles dans la nouvelle version du Code civil. L'article 1123 définit le pacte de préférence et expose les sanctions de sa violation. L'article 1124, quant à lui, définit la promesse unilatérale et prévoit la sanction de la révocation de cette promesse.

S'agissant de la **durée des contrats**, l'ordonnance propose une section entière sur ce thème. Rappelons que l'actuelle rédaction du Code civil ne comporte aucune disposition générale sur ce sujet, pourtant source d'un important contentieux. Ainsi, par exemple, l'article 1210 entérine la prohibition des engagements perpétuels.

Concernant le contenu du contrat, il est à noter que le nouvel article 1170 du Code civil consacre la célèbre jurisprudence « Chronopost » de 1996 relative aux **clauses limitatives de responsabilité** : celles-ci seront réputées non écrites si elles privent « *de sa substance l'obligation essentielle du débiteur* ».

S'agissant des effets du contrat entre les parties, l'ordonnance en date du 10 février 2016 introduit la notion d'**imprévision** dans le Code civil (article 1195), notion traditionnellement issue de la jurisprudence administrative :

« *Si un changement de circonstances imprévisible lors de la conclusion du contrat rend l'exécution excessivement*

onéreuse pour une partie qui n'avait pas accepté d'en assumer le risque, celle-ci peut demander une renégociation du contrat à son cocontractant. Elle continue à exécuter ses obligations durant la renégociation ».

Par ailleurs, la section IV du chapitre IV relatif aux effets du contrat introduit le régime juridique de la **cession du contrat**.

La section V de ce même chapitre, propose, quant à elle, de réunir toutes les dispositions concernant l'**inexécution du contrat** en une seule et unique section, remédiant ainsi aux dispositions éparses et incomplètes de l'actuelle rédaction du Code civil.

Une autre nouveauté est à noter, elle concerne la définition de la **force majeure**, actuellement fixée par la jurisprudence : « *Il y a force majeure en matière contractuelle lorsqu'un événement échappant au contrôle du débiteur, qui ne pouvait être raisonnablement prévu lors de la conclusion du contrat et dont les effets ne peuvent être évités par des mesures appropriées, empêche l'exécution de son obligation par le débiteur. Si l'empêchement est temporaire, l'exécution de l'obligation est suspendue à moins que le retard qui en résulterait ne justifie la résolution du contrat. Si l'empêchement est définitif, le contrat est résolu de plein droit et les parties sont libérées de leurs obligations dans les conditions prévues aux articles 1351 et 1351-1* ».

De la même façon, l'**exception d'inexécution**, aujourd'hui absente du Code civil, mais consacrée par la jurisprudence, fait son apparition avec le nouvel article 1219. Celui-ci définit l'exception d'inexécution comme la possibilité qu'a une partie de refuser d'exécuter son obligation si l'autre n'exécute pas la sienne et si cette inexécution est suffisamment grave.

Concernant la résolution du contrat, l'ordonnance introduit dans le Code civil la **résolution unilatérale** par notification du créancier de l'obligation non exécutée (article 1226).

Il convient de noter que le débiteur peut à tout moment saisir le juge pour contester la résolution. Dans ce cas, le créancier devra prouver « la gravité de l'inexécution ». Le créancier devra alors justifier la suffisante gravité de l'inexécution.

S'agissant de la responsabilité extracontractuelle, un nouveau dispositif est mis en œuvre, la **mise en demeure du créancier**. Celle-ci permet au débiteur de se libérer « en consignat la somme due ou en séquestrant la chose devant être livrée ».

S'agissant des modes de preuve, un nouveau principe voit le jour avec cette réforme du droit des obligations, celui selon lequel **une copie fiable** a la même force probante **que l'original** (article 1379) : « La copie fiable a la même force probante que l'original. La fiabilité est laissée à l'appréciation du juge. Néanmoins est réputée fiable la copie exécutoire ou authentique d'un écrit authentique. Est présumée fiable jusqu'à preuve du contraire toute copie résultant d'une reproduction à l'identique de la forme et du contenu de l'acte, et dont l'intégrité est garantie dans le temps par un procédé conforme à des conditions fixées par décret en Conseil d'État. Si l'original subsiste, sa présentation peut toujours être exigée ».

Ce nouveau texte achève de placer sur le même plan l'écrit sur support papier et l'écrit sur support électronique, dont le régime juridique, et par conséquent celui de leurs copies, doit être le même, afin de prendre en compte les évolutions technologiques.

Voici pour un résumé succinct de la réforme

Ces notions, qui peuvent paraître trop juridiques, étaient néanmoins nécessaires à la compréhension de l'importance de cette réforme.

Nous nous attacherons désormais aux incidences de cette réforme du droit des contrats et du régime général des obligations sur la vie des entreprises, et spécialement des LBM. ■■

DROIT DES SOCIÉTÉS

Compte de résultat des petites entreprises - publication

On rappelle que la loi Macron du 6 août 2015, stipule que les sociétés répondant à la définition des petites entreprises (sociétés ne dépassant pas deux des trois seuils suivant : 4 millions d'euros de total du bilan, 8 millions d'euros de chiffre d'affaires net, 50 salariés employés en moyenne au cours de l'exercice) **qui n'appartiennent pas à un groupe** pourront demander que le compte de résultat afférent à tout **exercice clos à compter du 31 décembre 2015** qu'elles déposeront au greffe **à compter du 7 août 2016** ne soit pas rendu public.



© georgejmclittle/fotolia.com

Le décret précisant les conditions d'application de cette mesure vient d'être publié*. Il prévoit que les petites entreprises exerçant cette faculté devront accompagner les documents comptables déposés au greffe d'une **déclaration de confidentialité** de leur compte de résultat établie conformément à un modèle défini par un arrêté (à paraître) du ministre de la justice.

La situation des petites entreprises est ainsi alignée sur celle des **micro-entreprises** qui choisissent de ne pas rendre publics leurs comptes annuels, celles-ci devant aussi accompagner les documents comptables déposés au greffe d'une déclaration de confidentialité de leurs comptes conforme au modèle annexé à l'article A 123-61-1 du Code de commerce.

*Décret 2016-296 du 11 mars 2016 art. 16 : JO du 13 mars texte n° 29

RÉGLEMENTATION PROFESSIONNELLE

Vérification de l'identité des patients

Suite à une demande de précision au sujet des règles d'identité-vigilance adressée à l'Ordre des pharmaciens par Jean-Louis Pons, vice-Président exécutif du SDB, la section G rappelle, par la voix de son Président Philippe Piet, que le biologiste médical « n'a aucune obligation ni possibilité de vérifier l'identité du patient, conformément aux dispositions du Code de procédure pénale ».

« En revanche, précise-t-il, il a toute latitude pour demander une justification de l'identité. En cas de refus du patient, le biologiste peut, éventuellement, porter sur le compte rendu d'examen que cette justification a été refusée. » * ■■

*Communiqué SDB

*Ord. 2016-131 du 10 février 2016; JO du 11 février texte n° 26

TEXTES JURIDIQUES

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 28/2/2016)

Arrêté du 25 février 2016 relatif à la classification et à la prise en charge des prestations d'hospitalisation, des médicaments et des produits et prestations pour les activités de soins de suite ou de réadaptation et les activités de psychiatrie exercées par les établissements mentionnés aux d et e de l'article L. 162-22-6 du code de la sécurité sociale et pris pour l'application de l'article L. 162-22-1 du même code

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032112881&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 3/3/2016)

Arrêté du 22 février 2016 fixant la composition de la Commission nationale de biologie médicale

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032146300&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 6/3/2016)

Décret n° 2016-273 du 4 mars 2016 relatif à l'assistance médicale à la procréation

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032154926&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 12/3/2016)

Arrêté du 4 février 2016 portant création d'un traitement automatisé de données à caractère personnel permettant la gestion des épreuves classantes nationales informatisées

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032188246&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 2 mars 2016 relatif à l'intégration dans la fonction publique hospitalière de personnels d'établissements privés à caractère sanitaire ou social

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032188257&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 13/3/2016)

Décret n° 2016-291 du 11 mars 2016 relatif à la commission médicale d'établissement, au règlement intérieur et aux fonctions de chefs de services et de responsables de départements, unités fonctionnelles ou structures internes des établissements publics de santé

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032189148&dateTexte=&categorieLien=id>

LOIS (JO du 15/3/2016)

LOI n° 2016-297 du 14 mars 2016 relative à la protection de l'enfant

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032205234&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 18/3/2016)

Décret n° 2016-314 du 16 mars 2016 relatif au Comité national du pacte territoire-santé

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032243054&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 16 mars 2016 relatif au Comité national du pacte territoire-santé

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032243093&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère de l'Agriculture (JO du 18/3/2016)

Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032251629&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 25/3/2016)

Arrêté du 22 mars 2016 portant approbation du cahier des charges national relatif à l'expérimentation d'espaces de réduction des risques par usage supervisé, autrement appelés «salles de consommation à moindre risque» [ou salles de shoot – NDLR]

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032291220&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 27/3/2016)

Arrêté du 25 mars 2016 portant désignation du centre d'accueil et d'accompagnement à la réduction des risques pour usagers de drogues Gaia pour la mise en place d'un espace de réduction des risques par usage supervisé à Paris [idem]

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032295861&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 25 mars 2016 portant désignation du centre d'accueil et d'accompagnement à la réduction des risques pour usagers de drogues Ithaque pour la mise en place d'un espace de réduction des risques par usage supervisé à Strasbourg [idem]

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032295868&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 30/3/2016)

Décision du 23 février 2016 de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie [Des actes-clés de biologie]

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032304168&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 21 mars 2016 relatif à l'organisme chargé de la réception des déclarations des produits chimiques dans le cadre des articles L. 4411-4 du code du travail et R. 1342-13 du code de la santé publique

Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032304045&dateTexte=&categorieLien=id>



© freshidea/fotolia.com

ÉCHOS PARLEMENTAIRES

Alzheimer et outre-mer ?

Inquiétude du sénateur Georges Patient : que fait-on pour le diagnostic des malades d'Alzheimer en outre-mer, demande-t-il au ministère de la Santé. La maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées constituent aujourd'hui un défi majeur de santé publique, or le nombre de malades ne cesse de croître en outre-mer avec le vieillissement de la population. Il est plus que nécessaire de diagnostiquer plus précocement, de permettre ainsi une meilleure prise en charge des malades. En conséquence, quelles sont les mesures envisagées par le gouvernement pour parvenir à un meilleur diagnostic.

Réponse du ministère : outre l'extension à d'autres maladies (Parkinson, sclérose en plaques), le nouveau Plan maladies neurodégénératives 2014-2019 a pour objectif de poursuivre et de consolider les avancées des précédents plans Alzheimer. Le premier enjeu du nouveau plan vise à *favoriser un diagnostic de qualité et éviter les situations d'errance* [diagnostique]. Il implique diverses mesures : communiquer vers les patients et les familles sur l'intérêt d'une prise en charge au plus tôt de la maladie ; mettre en place les conditions d'une orientation rapide vers le neurologue et d'un suivi post-diagnostic par celui-ci qu'il exerce en ville ou à l'hôpital, en coordination avec le médecin traitant ; permettre un meilleur accès à l'expertise sur le territoire avec la création de 24 centres experts dédiés à la sclérose en plaques, la consolidation des 25 centres spécialisés Parkinson, en complément des centres de référence Alzheimer existants.

Ces mesures, à l'instar de l'ensemble du plan, seront déclinées sur l'ensemble du territoire national, y compris dans les territoires d'outre Mer, garantit le ministère...

J.-M. M.

Pesticides : salades à risque ?

Hubert Falco attire l'attention du ministère de l'Agriculture sur les résidus de pesticides découverts dans des salades vendues en France. Selon l'association Générations Futures, une salade sur 10 contiendrait des produits chimiques interdits en France depuis des dizaines d'années, résidus de pesticides prohibés - notamment le (très connu) dichloro-diphényle-trichloréthane (DDT), perturbateur endocrinien très puissant - qui, même pré-

sents en faible quantité, peuvent s'ils sont mélangés, avoir des conséquences graves sur la santé. Est-il prévu de prendre des mesures pour faire respecter le règlement européen interdisant l'usage de ces pesticides et les moyens mis en œuvre pour lutter contre le trafic des pesticides avec certains pays frontaliers.

Précision du ministère de l'Agriculture : *Générations Futures* a réalisé des analyses portant sur 30 échantillons de salades prélevées sur des points de ventes, dont certaines ont montré la présence de résidus de produits phytopharmaceutiques interdits en France. Cependant, la provenance n'étant pas spécifiée pour chaque échantillon de salade, il n'est pas possible d'affirmer que ces résidus proviendraient d'un produit interdit en France. Par ailleurs, la détection de traces de substances interdites sur un végétal peut avoir pour origine une contamination antérieure des sols par des produits à rémanence forte. Ce phénomène est bien décrit pour le DDT.



© coco/fotolia.com

Les résultats des analyses citées indiquent la présence de substances en dessous des limites maximales autorisées. Chaque année, dans le cadre du dispositif de sécurité sanitaire des aliments, le ministère pilote des plans de surveillance et de contrôle des denrées animales et végétales, pour détecter la contamination des productions végétales. Ces plans sont les outils essentiels de la sécurité sanitaire des aliments et contribuent aussi à valoriser l'agroalimentaire français à l'exportation. Plus de 6 000 contrôles sont réalisés chaque année, à l'occasion desquels des prélèvements de végétaux sont effectués pour rechercher des résidus de pesticides. Le bilan de ces contrôles est publié annuellement sur le site du ministère. Depuis 2014, le nombre de prélèvements de végétaux pour recherche de résidus de produits phytosanitaires a été multiplié par deux, soit 1 600 programmés chaque année, dont 235 prélèvements de salades. ■■

J.-M. M.

Pression sur l'accréditation des LBM : des patients inquiets ?

Le sénateur du Gard Jean-Paul Fournier alertait l'an dernier le ministère de la Santé quant à la publication du décret n° 2015-205 du 23 février 2015 relatif aux modalités de dépôt des demandes d'accréditation des LBM, prévues en application du I de l'article 7 de l'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, décret qui anticipe certaines mesures de la loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale.

Prolifération du moustique tigre : le manque d'insecticides !

À 2 semaines de Noël 2015, le sénateur de l'Aude Roland Courteau évoquait pour le ministère de l'Écologie la prolifération du moustique tigre dans le sud de la France, rappelant que le moustique tigre (*Aedes albopictus*) est vecteur de maladies comme la dengue ou le chikungunya, mais aussi de virus particulièrement dangereux pour... les chiens et les chats, faisant remarquer notamment que l'Entente interdépartementale pour la démoustication (EID) du littoral méditerranéen est particulièrement préoccupée de cette prolifération, malgré ses actions contre les gîtes larvaires et les moustiques adultes. Les conséquences de cette prolifération sont aussi économiques en raison des problèmes qu'elle pose au tourisme. Il faut des mesures pour lutter plus efficacement contre cette prolifération.

La lutte antivectorielle vise à éviter une épidémie en maîtrisant le risque de transmission d'un virus par des vecteurs, répond le ministère, avec des moyens préventifs et curatifs : veille entomologique, comportements préventifs, insecticides.

Problème, le marché des insecticides anti-moustiques est très limité en Europe, l'encadrement réglementaire et les coûts de développement pour mettre sur le marché un produit biocide réduisent sensiblement l'intérêt de ce domaine pour les industriels de la chimie. Conséquence directe, les produits disponibles sont de plus en plus rares. Actuellement seuls peuvent être utilisés ceux contenant soit du BTI (*Bacillus thuringiensis*), efficace contre les larves de moustiques, soit de la deltaméthrine, efficace contre les moustiques adultes.

En métropole, grâce à un usage jusqu'ici adapté des insecticides et à une veille rigoureuse, les moustiques, dont le moustique tigre, n'ont pas développé de résistance. Dès lors, le recours à ces insecticides via les campagnes organisées par les organismes publics de démoustication est aujourd'hui l'arme essentielle de la lutte antivectorielle et le travail des équipes de démoustication doit être salué.

Face à la réduction du nombre de substances utilisables pour la lutte chimique, le ministère de l'écologie a demandé à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) d'identifier les insecticides utilisés dans d'autres États membres et qui pourraient l'être aussi en France, ainsi que les substances les plus prometteuses pour développer de nouveaux produits anti-moustiques. Son bilan est attendu cette année. À l'issue des résultats de cette saisine, compte tenu de cet enjeu de santé publique, l'objectif est de mobiliser les industriels afin de mettre en œuvre des actions concrètes en vue du développement et de la mise sur le marché de produits alternatifs à ceux actuellement disponibles. L'entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen (EID Méditerranée) est partie prenante dans cette démarche dans le cadre d'un groupe de travail lancé par le ministère de l'Écologie avec le ministère de la Santé.



© julians/fotolia.com

En effet, rappelait à l'époque (mars 2015) le parlementaire, les LBM publics et privés ne pourront fonctionner, à partir du 30 avril 2015, sans disposer d'une accréditation du COFRAC, portant sur 50 % des examens de biologie médicale, alors que la loi avait prévu un délai allant jusqu'au 31 octobre 2016. Cette anticipation de 18 mois risque d'être difficile à appliquer par nombre de LBM indépendants mais aussi de LBM publics hospitaliers, autant pour raison financière que de délai. Cette décision, ajoutait JP Fournier, va fragiliser la profession, laissant présager un rachat massif de certains laboratoires privés, dans l'incapacité de faire front à ces nouvelles normes.

Cette réorganisation à venir n'est pas de nature à rassurer les patients, qui sont pourtant globalement satisfaits du service rendu par ces laboratoires de proximité, partie intégrante de la qualité du système médical français. Elle risque également d'engendrer le dépôt de bilan de certains établissements et donc le licenciement de dizaines, voire de centaines de leurs salariés. Parallèlement, la mise en place de ce décret à l'hôpital aura pour conséquence directe d'alourdir financièrement les actes médicaux et donc d'aboutir à une restructuration massive de la biologie hospitalière.

D'où question : précision quant à l'application de ce décret, notamment dans la préparation d'un décret dérogatoire qui pourrait concerner la biologie hospitalière, mais aussi, par souci d'égalité, privée, définition des grandes lignes de la politique gouvernementale pour la biologie médicale et l'avenir des laboratoires indépendants.

Rappel du ministère (4/2/2016) : l'ordonnance du 13 janvier 2010, ratifiée par la loi du 30 mai 2013, prévoit qu'à compter du 31 octobre 2016, les LBM ne pourront plus fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 50 % des examens de biologie médicale. Pour organiser l'accréditation de l'ensemble des laboratoires, et afin d'être certain qu'ils puissent bénéficier d'une procédure d'accréditation dans de bonnes conditions, le décret du 23 février 2015 a organisé le dépôt des dossiers de demande d'accréditation COFRAC.

Il ne s'agit en aucun cas, par ce décret, de réduire les délais d'accréditation obligatoire mais au contraire de permettre aux laboratoires de biologie médicale de ne pas se mettre en difficulté par rapport à cette exigence.

Il faut rappeler que l'obligation d'accréditation est inscrite dans la loi depuis 2010 et ne constitue donc en aucun cas une surprise pour les professionnels, dit le ministère. Le regroupement des laboratoires n'est pas uniquement lié à la nécessité de mise en œuvre de l'accréditation, elle vise à promouvoir la création de laboratoires multisites. Les laboratoires publics sont concernés au même titre que les laboratoires privés : l'objectif est d'être suffisamment efficient et polyvalent pour rendre aux patients les services attendus en matière de qualité et d'offre diversifiée d'examens de biologie médicale.

J.-M. M.

J.-M. M.



Prévention de la myopie de l'enfant : il faut jouer dehors

En mai dernier, Catherine Procaccia, sénatrice, interrogeait le ministère de la Santé sur la prévention de la myopie, arguant que le nombre de myopes a doublé en Europe ces dernières années, une augmentation particulièrement notable dans les populations les plus jeunes. Selon les données récentes, les facteurs de myopie ne seraient pas exclusivement génétiques mais aussi liés à l'exposition à la lumière du jour. Des expérimentations semblent prouver que le fait de passer moins de 3 heures par jour hors du domicile augmenterait les risques de myopie chez les jeunes.

Le gouvernement compte-t-il mener une campagne d'information et de sensibilisation sur ce sujet tant auprès des parents que des pédiatres et dans les écoles... sans attendre une confirmation scientifique, puisque favoriser l'exposition à la lumière naturelle ne peut être que bénéfique...

Réponse du ministère : chez l'enfant, le dépistage des troubles visuels, responsables de difficultés scolaires et dans la vie courante, est important du fait de leur prévalence (20 %). La myopie peut être diagnostiquée lors des examens médicaux réguliers au cours de l'enfance, qui ont pour but, entre autres, le dépistage précoce des anomalies ou déficiences sensorielles, notées dans le carnet de santé. La prévention doit intervenir avant le dépistage. Comme l'a montré une étude parue dans le JAMA (15/9/2015), 40 minutes d'activité quotidienne en plein air réduiraient de 23 % la survenue de la myopie de l'enfant, d'où recommandation d'inciter l'enfant à *jouer dehors* (sic).

La loi de modernisation du système de santé prévoit notamment un parcours-santé éducatif, de l'école maternelle au lycée. L'école est le lieu idéal, prêche le ministère, pour faire connaître ces gestes du quotidien et sensibiliser enfants et adolescents aux grands enjeux de santé et éviter les conduites à risque, quel que soit le lieu de leur scolarisation ou leur état de santé. Quant à l'information du public, les messages contenus dans les plaquettes de l'Institut national de prévention et d'éducation à la santé (INPES), dans le cadre du Plan national nutrition santé (PNNS) : *Recommandations sur l'alimentation et l'activité physique pour les enfants et les adolescents, J'aime manger, j'aime bouger*, préconisent une activité physique régulière, notamment en milieu extérieur.

J.-M. M.

Expansion de la maladie à virus Zika

La Guadeloupe est l'un des pays qui se trouve sous la menace de l'expansion mondiale du virus Zika. Félix Desplan, sénateur de la Guadeloupe, indique très justement au ministère de la Santé que, après une croissance fulgurante au Brésil, ce virus Zika, que l'OMS a qualifié d'*urgence de santé publique de portée mondiale*, a atteint la Guyane et les Antilles. On déconseille aux femmes enceintes ou ayant un projet de grossesse de se rendre dans ces départements, la relation entre la recrudescence de microcéphalies ou d'autres malformations fœtales ou néonatales graves et une infection par ce virus chez la mère étant suspectée.

Cette relation n'est pas scientifiquement démontrée, indique le parlementaire. D'autres agents infectieux ou facteurs sont peut-être aussi en cause, seuls des travaux *sophistiqués* pourraient l'établir. Mais le constat est terrible : 150 cas de microcéphalies recensés au Brésil en 2014, mais plus de 4 000 depuis 2015, essentiellement dans les provinces touchées par le virus.

Dans nos départements, ce message a suscité une vive inquiétude, d'abord chez les femmes enceintes ou souhaitant le devenir. Elles doivent être informées des précautions à prendre et bénéficier éventuellement d'une aide financière pour acheter les produits nécessaires... Elles doivent faire l'objet d'une surveillance clinique et biologique renforcée puisque, dans la grande majorité des cas, l'infection par le Zika ne provoque aucun symptôme marquant. Question : mettez-vous en place des protocoles particuliers, par exemple, un suivi échographique soutenu ?

Réponse du Ministère de la Santé (3/2/2016) : nous sommes confrontés au niveau mondial à une épidémie nouvelle à virus Zika, qui affecte massivement l'Amérique Latine et a atteint en décembre certains territoires français. C'est une menace pour la Guyane, la Martinique et la Guadeloupe.



Cette épidémie appelle des réactions fortes, d'abord en direction des populations, l'inquiétude qui domine concerne les femmes enceintes. Le fait que l'OMS ait annoncé le 2 février qu'elle déclare l'épidémie de Zika *urgence de santé publique de portée mondiale* va favoriser la recherche et permettre notamment de déterminer le lien entre le Zika et des malformations congénitales. D'ici là, il faut permettre aux femmes enceintes des territoires touchés d'être suivies, accompagnées et bien prises en charge. En décembre un protocole de prise en charge a été mis en place, en lien avec les professionnels de santé. La recommandation aux femmes enceintes de ne pas se rendre dans les territoires où sévit l'épidémie vaut aussi pour les pays étrangers qu'elle touche, une position que partagent les États-Unis et le Canada. Quant aux autorités du Brésil, elles viennent de recommander aux femmes enceintes de ne pas se rendre à Rio pour les Jeux Olympiques cet été.

Il existe bien un danger de santé publique et, sans inquiéter outre mesure, les services de santé travaillent de façon sereine (*sic*), afin d'apporter la meilleure protection à nos concitoyennes partout sur le territoire.

NDLR-Trois équipes de la réserve sanitaire ont été envoyées à la mi-février dans ces 3 départements d'outre-mer pour agir en liaison avec les ARS respectives.

J.-M. M.

Lait maternel vendu sur Internet, danger ?

Un peu plus de 2 ans après sa question au ministère de la Santé, la sénatrice Patricia Schillinger a obtenu une réponse concernant l'affaire du lait maternel vendu sur Internet. Selon une étude américaine, disait-elle, 75 % du lait maternel vendu ainsi est dangereux, car il contient beaucoup plus de bactéries que le lait distribué en lactarium, d'où danger pour le nourrisson. Toujours selon cette étude, plus de 60 % des échantillons obtenus en ligne contenaient des staphylocoques et 30 % des streptocoques, des bactéries comme *Salmonella* et *E. coli* sont également détectées en proportions plus importantes que la normale.

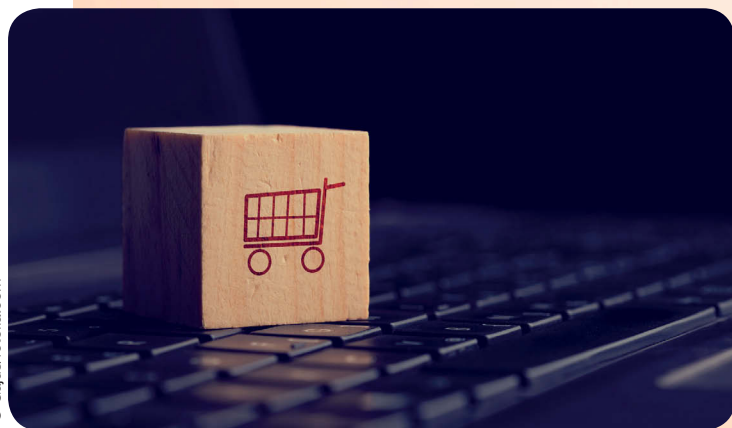
Quant aux échantillons en provenance de lactariums, 25 % d'entre eux contenaient des staphylocoques et 20 % des streptocoques. Quel est l'avis du gouvernement sur ce sujet de santé publique.

Réponse du Ministère de la santé : cette question trouve son origine dans un article faisant référence à une étude réalisée aux USA, où les exigences de sécurité sont différentes de celles qu'impose la France, où la collecte, la préparation, la qualification, le traitement, la conservation, la distribution et la délivrance du lait maternel sont strictement encadrés et seulement assurés par des lactariums gérés par des établissements publics de santé, des collectivités publiques ou des organismes sans but lucratif, autorisés par l'ARS du lieu d'implantation du lactarium.

Dans ce cadre, l'ANSM donne son avis technique au directeur général de l'ARS sur la demande d'autorisation d'un lactarium. Des tests bactériologiques obligatoires sont pratiqués avant et après pasteurisation d'un don de lait, alors que seuls des tests post-pasteurisation sont imposés en Amérique du Nord. Par ailleurs, l'ANSM assure également les activités de contrôle, de vigilance et d'inspection et définit les règles de bonnes pratiques des lactariums. Le réseau et les produits des lactariums sont donc l'objet de contrôles actifs par l'ANSM afin de garantir sécurité et qualité.

Ainsi l'achat de lait maternel sur des sites non référencés expose à des risques pour la santé des nouveau-nés et des jeunes enfants susceptibles de recevoir un lait dont la qualité et l'innocuité ne peuvent être garanties. Les autorités sanitaires telle l'ANSM mettent en garde contre les risques liés à l'échange de lait maternel et à sa vente en ligne. Ils sont évoqués sur le site de l'ANSM (www.ansm.sante.fr). De façon générale, le ministère de la Santé insiste sur l'importance de règles strictes encadrant la vente de produits de santé sur Internet. ■■

Jean-Marie Manus



© Gajus/fotolia.com



© Norwayblue/fotolia.com